

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2000-506492

(P2000-506492A)

(43) 公表日 平成12年5月30日 (2000.5.30)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 H 19/23		C 0 7 H 19/23	
19/20		19/20	
21/00		21/00	
C 1 2 N 15/01	ZNA	C 1 2 N 15/00	ZNAE

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 77 頁)

(21) 出願番号 特願平9-512495
 (86) (22) 出願日 平成8年9月19日 (1996.9.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成10年3月23日 (1998.3.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB96/02333
 (87) 国際公開番号 WO97/11083
 (87) 国際公開日 平成9年3月27日 (1997.3.27)
 (31) 優先権主張番号 9519425.4
 (32) 優先日 平成7年9月22日 (1995.9.22)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)
 (31) 優先権主張番号 9602011.0
 (32) 優先日 平成8年2月1日 (1996.2.1)
 (33) 優先権主張国 イギリス (GB)

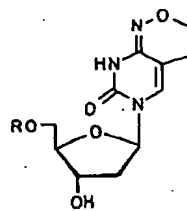
(71) 出願人 アマシャム・ファーマシア・バイオテック・ユー・ケイ・リミテッド
 イギリス、エイチ・ビー・7 9・エヌ・エイ バッキンガムシャー、リトル・チャルフォント、アマシャム・プレイス (番地なし)
 (72) 発明者 ウィリアムズ, デイビッド
 イギリス、エス・10 1・エル・ユー シェフィールド、レミントン・ストリート、51
 (74) 代理人 弁理士 深見 久郎 (外3名)

最終頁に続く

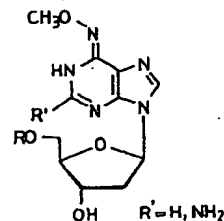
(54) 【発明の名称】 核酸の突然変異誘発におけるまたはそれに関する改良

(57) 【要約】

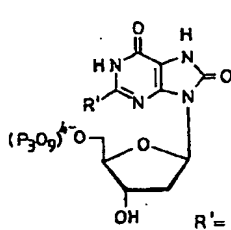
この発明は、規定された構造式を有する新規な化合物と、核酸配列を突然変異させるための方法とに関する。この発明の方法は、この発明に従ったヌクレオシド三リン酸類似体の存在下でテンプレート配列を複製し、それにより、1つまたはそれ以上のヌクレオシド三リン酸類似体残基を含むテンプレート配列の非同一的複製物を生成させるようにするステップを含む。この発明はさらに、この発明の方法を行なうために用いられるキットに関する。



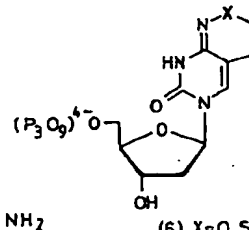
(1) R = H
 (2) R = (P₃O₉)⁴⁻



(3) R = H
 (4) R = (P₃O₉)⁴⁻



(5)

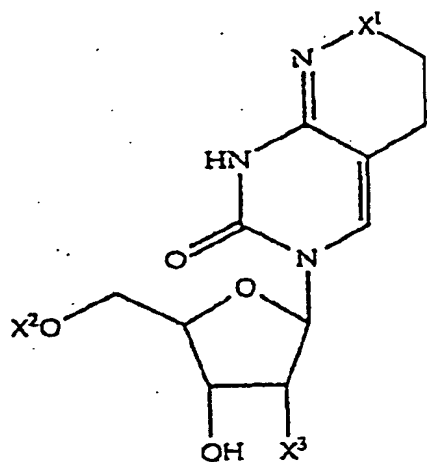


(6) X = O, S, N-アシル

Fig. 1

【特許請求の範囲】

1. 以下の構造を有する化合物であって、



式中、 X^1 はO、S、N-アルキル、 N^+ -ジアルキルまたはN-ベンジルであり、 X^2 は三リン酸(P_3O_9) $^{4-}$ 、二リン酸(P_2O_6) $^{3-}$ 、チオ三リン酸(P_3O_8S) $^{4-}$ またはそれらの類似体であるが、Hではなく、かつ X^3 はH、 NH_2 、FまたはORであり、ただしRは任意の基であってよいが好ましくはH、メチル、アリルまたはアルカールである、化合物。

2. X^1 はOである、請求項1に記載の化合物。

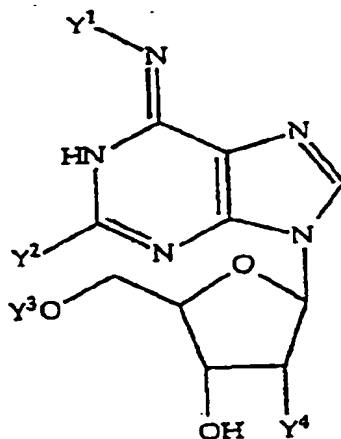
3. X^2 は三リン酸であり、かつ X^3 はHまたはOHである、請求項2に記載の化合物dPTP。

4. 核酸配列を突然変異させるための方法であって、請求項1、2または3のいずれかに記載のヌクレオシド三リン酸類似体の存在下でテンプレート配列を複製して、1つまたはそれ以上のヌクレオシド三リン酸類似体残基を含む前記テンプレート配列の非同一的な複製物を生成させるようにすることを含む、方法。

5. デオキシP三リン酸(dPTP)またはそれと機能的に均等なものの存在下でテンプレート配列を複製し、1つまたはそれ以上のdPヌクレオチド残基を含む前記テンプレート配列の非同一的な複製物を生成させるようにすることを含む、請求項4に記載の方法。

6. 前記テンプレート配列が、1つまたはそれ以上の付加的なヌクレオシド三リン酸類似体の存在下で複製される、請求項4または5に記載の方法。

7. 前記テンプレート配列が、以下の構造を有する化合物の存在下で複製され、



式中、Y¹はOH、O-アルキル、NH₂またはN（アルキル）₂であり、Y²はHまたはNH₂であり、Y³は三リン酸（P₃O₉）⁴⁻、二リン酸（P₂O₆）³⁻、チオ三リン酸（P₃O₈S）⁴⁻またはそれらの類似体であるが、Hではなく、かつY⁴はH、NH₂、FまたはORであり、ただしRは任意の基であってよいが好ましくはH、メチル、アリルまたはアルカリールである、請求項4から6のいずれかに記載の方法。

8. 前記テンプレート配列が、8-オキソdGTPおよび/またはdKTPおよび/またはO²-エチルチミジン三リン酸の存在下で複製される、請求項4から6のいずれかに記載の方法。

9. 4つの正常なdNTPが存在する一方、それらの類似体が存在しない状態で、前記テンプレート配列の前記非同一な複製を複製物し、前記4つの正常なデオキシヌクレオチドのみを含む前記テンプレート配列のさらなる非同一な複製物を生成させるステップをさらに含む、請求項4から8のいずれかに記載の方法。

10. 前記テンプレート配列の複製、および/またはその前記非同一な複製物の複製が、PCRによって行なわれる、請求項4から9のいずれかに記載の方法。

11. 前記テンプレート配列が、前記4つの正常なデオキシヌクレオチドの付加的な存在下で複製される、請求項4から10に記載の方法。

12. 前記テンプレート配列が、1 μMから600 μMのdPTPの存在下で複製される、請求項4から11のいずれかに記載の方法。

13. 前記テンプレート配列が、 $1\mu\text{M}$ から $600\mu\text{M}$ の8-オキソdGTPの存在下で複製される、請求項4から12のいずれかに記載の方法。

14. 請求項1から3のいずれかに記載のヌクレオシド三リン酸類似体と、テンプレート配列を複製して前記テンプレート配列の非同ーな複製物に前記ヌクレオシド三リン酸類似体を取込むようにするための手段と、請求項4から13のいずれかに記載の方法に従って用いるための使用説明書とを含む、請求項4から13のいずれかに記載の方法を行なうためのキット。

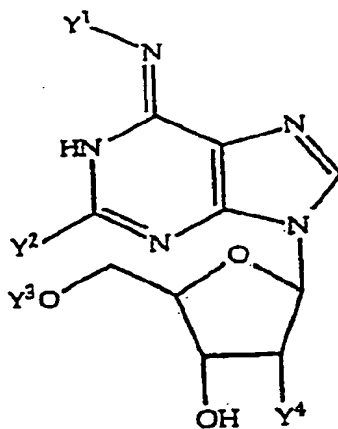
15. 前記ヌクレオシド三リン酸類似体がdPTPである、請求項14に記載のキット。

16. 前記テンプレート配列を複製するための手段が、ポリメラーゼ連鎖反応を行なうための手段を含む、請求項14または15に記載のキット。

17. 4つの正常なデオキシヌクレオチドをさらに含む、請求項14から16のいずれかに記載のキット。

18. 8-オキソdGTPおよび/またはdKTPおよび/または O^2 エチルチミジン三リン酸をさらに含む、請求項14から17のいずれかに記載のキット。

19. 以下の構造を有する化合物であって、



式中、 Y^1 はOH、O-アルキル、 NH_2 またはN(アルキル) $_2$ であり、 Y^2 はHまたは NH_2 であり、 Y^3 は三リン酸(P_3O_9) $^{4-}$ 、二リン酸(P_2O_6) $^{3-}$ 、チオ三リン酸($\text{P}_3\text{O}_8\text{S}$) $^{4-}$ またはそれらの類似体であるが、Hではなく、かつ Y^4 はH、 NH_2 、FまたはORであり、ただしRは任意の基であつ

てよいが、好ましくはH、メチル、アリルまたはアルカリールである、化合物。

20. Y^1 は OCH_3 、 Y^3 は三リン酸であり、かつ Y^4 はHまたはOHである、請求項19に記載の化合物。

21. 請求項19または20に記載のヌクレオシド三リン酸類似体の存在下でテンプレート配列を複製し、1つまたはそれ以上のヌクレオシド三リン酸類似体を含む前記テンプレート配列の非同質な複製物を生成させるようにすることを含む、核酸配列を突然変異させるための方法。

22. 請求項21に記載され、かつ請求項4から13のいずれかに従った方法。

23. インビトロでDNA配列を生成させるための方法であって、4つの正常なdNTPおよび請求項1から3または請求項19から20に記載のヌクレオシド三リン酸類似体を含む混合物を、適当な条件下で、核酸のテンプレート鎖の存在下においてDNAポリメラーゼにより処理し、少なくとも1つの類似体を含む、ヌクレオチドの配列を生成させるようにすることを含む、方法。

24. インビトロでRNA配列を生成させるための方法であって、4つの正常なrNTPおよび請求項1から3または請求項19から20に記載のリボヌクレオシド三リン酸類似体を含む混合物を、適当な条件において、核酸のテンプレート鎖の存在下でRNAポリメラーゼによって処理し、少なくとも1つの類似体を含むリボヌクレオチドの配列を生成させるようにすることを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

名称：核酸の突然変異誘発におけるまたはそれに関する改良

発明の分野

本発明は、いくつかの新規な化合物、その新規な化合物にかかる核酸配列を突然変異させるための方法および本発明の方法を行なうためのキットに関する。

発明の背景

インビトロ位置指定突然変異誘発は、コードDNAにおいて適当な塩基残基を変化させることによりタンパク質中の1種類のアミノ酸を置換することにかかるものであり、タンパク質工学における有力な方法であることがわかっている。この技術は典型的に、性質の変化した突然変異体を生成させる理論的根拠を与えるために、研究下のタンパク質の構造と機能に関する情報を必要とする。対照的に、対象とするDNA領域のランダムな突然変異誘発と、適切なスクリーニングまたは選択処理法との組合せにより、構造に関する初期情報がなくても、改良されたまたは新しい機能を有するDNA、RNAまたはタンパク質種を生成させるための代替的かつ一般的な方法が得られる。

大きなDNAフラグメントの突然変異体を生成させるためのいくつかの方法が記載されており、これらはランダム配列合成オリゴヌクレオチドのプールの使用 (Matteucci & Heyneker, Nucl. Acids Res. 1983 11, 3113; Wellset al. Gene 1985 34, 315; Nerr et al., DNA 1988 7, 127およびそこにおける参考文献)、標的配列の化学修飾 (Kadonaga & Knowles, Nucl. Acids Res. 1985 13, 1733; Meyers et al, Science 1985 229, 242およびそこに記載の参考文献) または誤りがちのポリメラーゼを使用した塩基の誤った取込み (Lehtovaara et al, Protein Eng. 1988 2.63) を伴うものである。

合成オリゴヌクレオチドによるアプローチは、化学合成により影響を受けやすいDNAの長さによって制約を受け、化学的アプローチは労力がかかることが多い。他のアプローチでは、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いてランダム突然変異体を生成させる。そのような方法の1つは、Taq DNAポリメラーゼの固有の誤り頻度に全面的に依存するものであり、1つの塩基対につき約0.5

$\times 10^{-3}$ の突然変異体をもたらす (Zhou, Nucl. Acids Res. 1991 19, 6052)。
この方法を改良した変形例では、たとえば補因子マンガンの添加ならびに高濃度のマグネシウムおよび関連するデオキシヌクレオシド三リン酸 (dNTPs-Leung et al., Techniques 1989 1, 11参照) の使用により、Taq DNAポリメラーゼで触媒されるDNA合成の忠実度をさらに低減する条件下で、対象とする標的配列が複製される。後者の処理法を用いて、1つの塩基対につき 20×10^{-3} のオーダーの突然変異頻度が主張されている。

PCRに基づくランダムな突然変異誘発に代わるアプローチは、4種の本来のヌクレオシドの5'-三リン酸エステルを部分的にまたは全体的に、両面性塩基対の可能性を示すヌクレオシド類似体の三リン酸エステルで置換することである。我々の知る限りでは、このアプローチはデオキシイノシン三リン酸-dITP (Spee et al, Nucl. Acids Res. 1993 21, 777; Ikeda et al., J. Biol. Chem. 1992 267, 6291) を用いて試みられただけである。しかしながら、この類似体はTaqポリメラーゼには不十分な基質であり、4つの正常なdNTPのうちいずれかを置換えると、にDNA合成を持続させることができない。この結果、等しい濃度の3つのdNTPおよびdITPを含むとともに、4番目のdNTPの濃度を制限した、4回の別個のPCR反応が必要である。次いで、4種の別個のPCR生成物がプールされクローン化される (上記のSpee et al.)。

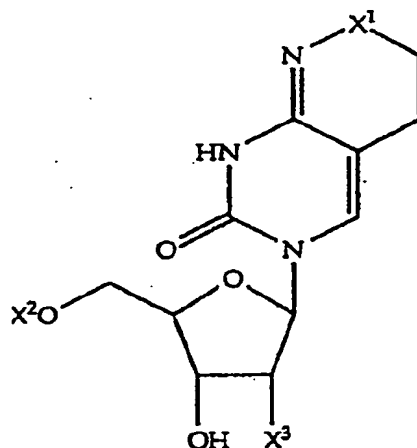
上記の処理法の一般的な特徴は、突然変異体配列の収率が低く、かつ突然変異のパターンがトランジション (ピリミジン-ピリミジン置換またはプリン-プリン置換) に著しく偏るという点である。さらに、後者の2つの方法を用いると、かなりの割合で望ましくない塩基の付加または欠失が生ずる。

代替的なアプローチでは、トランジション突然変異を誘発させることが可能なピリミジンまたはプリンヌクレオシドの類似体の5'-三リン酸エステルと、トランスバージョン突然変異を引起こすことが可能な他の三リン酸エステル類似体とを組合せることにより、PCRによる効率のよいランダム突然変異誘発が可能になると考えられている。ヌクレオシド類似体P (Kong Thoo Lin & Brown, Nucl. Acids Res. 1989 17, 10373) およびK (Brown & Kong Thoo Lin, Carbohydrate Res. 1991 216, 129) (それぞれ図1に示される構造1および3) はこれま

で既にオリゴヌクレオチドに組み込まれてきており、図2のPに関して示されるように両面性塩基対の可能性を示す。すなわち、Pはアデニンおよびグアニンとともに等しい安定性の塩基対を形成する。同様に、Kはチミンおよびシトシンとともに非常に類似した安定性の塩基対を形成する。さらに、これらの類似体を含むテンプレートDNAは、PCRにおけるTaqポリメラーゼおよびDNA配列決定におけるSequenase（商標）などのポリメラーゼによって認識される（Kong Thoo Lin & Brown, Nucleic Acids Res. 1992 20, 5149; Kamiya et al., Nucleosides & Nucleotides 1994 13, 1384; Brown & Kong Thoo Lin, Collect. Czech. Chem. Commun. (別刷), 1990 55, 213)。本発明者は、図1の構造5として示される、8-オキシdGTP (Pavlov et al, Biochemistry 1994 33, 4695) として省略される他の類似体、たとえば2'-デオキシ-8-ヒドロキシグアノシン5'-三リン酸が、トランスバージョン突然変異体を生成させるためにこの状況では有効であろうと考えた。

発明の概要

第1の局面において、本発明は以下の構造を有する化合物を提供する。



式中、 $X^1 = O, S, N\text{-アルキル}, N\text{-アールキル}, \text{または} N\text{-ベンジル}$ であり、 $X^2 = \text{三リン酸} (P_3O_9)^{4-}, \text{二リン酸} (P_2O_6)^{3-}, \text{チオ三リン酸} (P_3O_8S)^{4-}, \text{またはそれらの類似体であるが、Hではなく、さらに } X^3 =$

H, NH_2 , F または OR であり、ただし R は任意の基であつてよいが、好まし

くはH、メチル、アリルまたはアルカリールである。

これらの化合物はこれまで合成されていなかった。好ましい実施例において、 X^2 は三リン酸である。好都合には、 X^1 はOであり、好ましくは X^3 はHまたはOHである。典型的には、RはH、メチル、アリルまたはアルカリールである。これまで合成されている（かつ本発明の範囲外である）化合物「dP」は上記の一般構造を有し、式中 X^1 はOであり、 X^2 はHであり（このためこの化合物は本発明の範囲内ではない）、 X^3 はOHである。本発明の範囲内であり、その好ましい実施例を代表する新規な化合物は、dPTPと名づけるdPの三リン酸エステルである。

本発明の化合物、特にdPTPは、先行技術からは予測できなかった予想外の特性（それらのいくつかは後に説明される）を有し、したがって本発明は自明ではない。本発明の化合物は（特に X^3 がHまたはOHである場合に）ヌクレオシド三リン酸類似体として作用し得るため、幅広い可能な用途を有し、それらの用途のうち1つを以下に詳細に説明する。

本発明はまた、水素結合両面性プリンおよびピリミジンヌクレオシド三リン酸の合成ならびにPCRに基づいたランダムな突然変異誘発におけるそれらの応用に関し、さらには簡単なクローニング方法によって単一の種がそれから得られるような画定されたもののテンプレート配列に基づくポリヌクレオチドライブラリ（特に大きなライブラリ）の生成に関する。本発明は特に、（図1の）構造6に示されるタイプの新規な変性ピリミジンデオキシヌクレオシド三リン酸を、好ましい実施例においては、（図1の）構造5および／または構造4に示されるタイプの類似体とともに、合成および使用することに関する。本発明は、既に公知の類似体8-オキソdGTP（構造5、式中 $R' = NH_2$ ）（Mo et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992 89, 11021）に関連して、新規な三リン酸エステルdPTP（図1の構造2であり、その合成は以下により詳細に説明される）の混合物を使用したDNA配列のランダムな突然変異誘発のためのPCRに基づくシステムを用いて例証される。

したがって、本発明は、第2の局面において、先に規定した一般構造に従った

ヌクレオチド類似体の存在下でテンプレート配列を複製し、それにより、ヌクレオチド類似体残基を含むテンプレート配列の、非同一な複製物を形成することを含む、核酸配列を突然変異させる方法を提供する。好ましい実施例において、ヌクレオチド類似体は6-(2-デオキシ-β-D-エリトロペンチフラノシル)-3,4-ジヒドロ-8H-ピリミド-[4,5-c][1,2]オキサジーン-7-オン5'-三リン酸(デオキシP三リン酸またはdPTPとして省略される)である。

本発明の方法に用いるために、化合物の有用性を実質的に損なうことなく、dPTPの構造をわずかに変形してもよいことが当業者には明らかであろう。したがって、このようにわずかに変形したdPTPの形態は、dPTPの機能的に均等なものとして解することができ、それらの使用は先に規定した本発明の範囲内に入ると解釈される。このような変形した形態の具体例は図1の構造6に示され、式中XはS、N-アルキル(特にN-メチル、N-エチルまたはN-プロピル)、N'-ジアルキル(たとえばジメチル、ジエチルまたはジプロピル)またはN-ベンジル(ベンゼン環において置換基を有するかまたは有さないもの)とすることができる。類似体がDNAの中に組込まれたときの位置Xにおける基は、かなり嵩張った基が都合よく収められるよう、二重らせんの主溝の中に突出するものと考えられる。ここに含まれる開示とともにLoakes & Brown (1995 Nucleosides and Nucleotides 14, 291)の刊行物に鑑みて、上記の変形および可能な他の変形が当業者には明らかとなるであろう。

この方法によって生成される「非同一な複製物」は、テンプレートから合成される(かつしたがってその複製であると考えられ得る)DNA配列であるが、テンプレートに対して1つまたはそれ以上の突然変異を含むため、それと同一ではない。本発明によって達成される典型的な突然変異の頻度は1%から20%の範囲であり、より特定的には2%から10%であるが、ここに含まれる情報から当業者には、突然変異の頻度が所望のレベルの範囲になるよう調整可能であるにれば本発明の利点である)ことが明らかであろう。しかしながら、多くの目的のためには突然変異の頻度の範囲は1%から20%であることが好ましい。この範囲は、転写および/または翻訳の産物に顕著な変化が適当な確率で導入されるよ

う十分に高いものである一方、テンプレート配列の転写または翻訳の産物が有し得た所望の特性が不可避に損なわれるほど高くはないものである。

好ましくは、テンプレート配列は、酵素、望ましくは3', 5'-エキソヌクレアーゼ「編集」機能を有さないDNAポリメラーゼの使用を含む方法によって複製され、好都合には、典型的にはTaqポリメラーゼなどの耐熱性酵素を用いるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の実行によって複製される。好都合には、テンプレート配列は4つの正常なdNTP(すなわちdATP、dCTP、dGTPおよびTTP)の付加的存在下で複製される。典型的にはdPTPは4つの正常なdNTPの大部分と実質的に等モル比で存在するであろう(しかしながら、後に説明するように、所望の突然変異の数および性質ならびに他の試薬が存在するかまたは存在しないかによって、相対的な濃度を有利に変更してもよい)。

好ましい実施例では、テンプレート配列は1つまたはそれ以上の付加的な類似体三リン酸エステルの存在下で複製される。望ましくは、このような付加的な類似体によりトランスポージョン突然変異が引起こされる。所望の類似体三リン酸エステルの適当な例には、dKTPおよび8-オキシdGTP(上記)ならびにO²-エチルチミジン三リン酸が含まれる(Singer et al., 1989 Biochemistry 28, 1478-1483)。

テンプレート配列の非同ーな複製物が得られると、ヌクレオチド類似体残基を置換し突然変異を「確立」するため、複製物は4つの正常なdNTP(すなわちdGTP、dCTP、dATPおよびTTP)が存在する一方それらの類似体が存在しない条件下で複製されることが望ましい。この第2段階の複製は、(たとえば、ベクターに挿入されているかまたはされていない非同ーな複製物を、大腸菌または他の微生物などの適当な実験用生物に導入し、次いで、これらの生物が、導入されたDNAにおけるdPTP残基を本来のDNA修復機構によって置換することにより)インビボで行なってもよい。しかしながら、この第2段階の複製は好ましくはインビトロで行なわれ、好都合にはPCRによって行なわれる。これにより、DNA配列に導入しようとする突然変異の数およびタイプをさらに制御することが可能になり、(インビボでの第2段階の複製の実行と比較すると)宿主における修復酵素が、確立された突然変異に悪影響を及ぼすことが防がれ

る。

本発明の方法は公知の先行技術の突然変異誘発法に勝るいくつかの利点を与えることが見い出されている。

第1に、点突然変異を保有する配列の頻度が高まり、この点突然変異は多くの研究目的のために、最も情報を与えるタイプのと突然変異である。第2に、この方法はわずかな頻度でのみ挿入および欠失の突然変異を引起す。これは、重要である。なぜなら、このような突然変異はコード配列におけるフレームシフトを引起し、よって一般的には望ましくないからである。さらに、所望のトランスバージョンおよびトランジション突然変異が高い割合でもたらされ、このようなトランジション突然変異のすべての可能なタイプを得ることができる。テンプレート配列を複製するためにPCRを用いることは、突然変異の頻度の制御を可能にするため特に望ましい。驚くことに、発明者は、突然変異の頻度と行なわれるPCRのサイクル数との間には実質的に線形の相関性があることを見出した。この線形の相関性は約30PCRサイクルまでの間持続し、より広い範囲に及び得る。さらに、デオキシヌクレオシド三リン酸（および/またはその類似体）の濃度を変更すると突然変異の頻度にさらなる影響が及ぼされる。

したがって、要約すると、本発明の方法にはこれまで示されたものとは多くの相違点があり、これらの相違点には、次のようなものが挙げられる。（i）点突然変異を保有する高い頻度の配列をもたらすこと（ii）顕著な頻度で挿入および欠失を引起さないこと（iii）比較的高い率でトランスバージョンおよびトランジション突然変異を引起すこと（iv）すべての可能なタイプのトランジション突然変異およびいくつかのタイプのトランスバージョン突然変異を引起し得ること（v）単一のDNA増幅反応において効率のよい突然変異誘発を行なえること（vi）とりわけサイクル数、およびデオキシヌクレオシド三リン酸の割合により、増幅されたポリヌクレオチド生成における突然変異の積載量の制御を可能にすること、ならびに（vi）先行技術の方法を用いては問題があった（数千ベースまでの）非常に長い配列のランダム化に適していること。したがって、本発明に従ったヌクレオシド類似体の三リン酸エステル誘導体の、適当な混合物を用

いることにより、DNA配列のランダムな突然変異誘発を高度に制御できるようになり、この結果、既存の方法では効率よく達成できなかった、任意のDNAにお

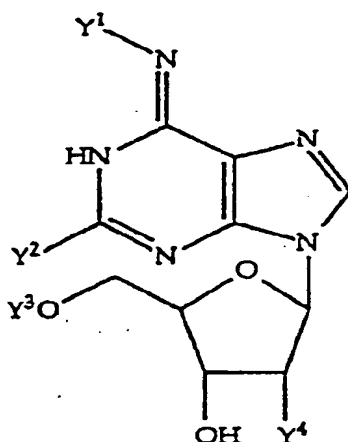
けるヌクレオチド置換、および誘導されたポリペプチドにおける対応するアミノ酸置換が可能になる。

本発明の方法は、タンパク質工学において明らかな有用性を有する。また、RNA分子の構造／機能の関係への関心は高まりつつある（たとえばBartel & Szostak 1993 Science 261, 1411-1418を参照）。

したがって、この方法は、変異した転写物（すなわちRNA）または翻訳物（すなわちポリペプチド）の合成に向けられる、DNA配列のライブラリの構成に特に有用であろう。先行技術の方法に関連してこれまで提示された問題点に鑑みて、本発明は（数キロベースまたはそれ以上の）長い配列のライブラリの調製に特に有用であろう。このようなライブラリは他のランダムな突然変異誘発方法によつては生成できないものである。

さらなる局面において、本発明は、核酸配列に突然変異を引起すためのキットを提供する。このキットは、dPTPと、その存在下でテンプレート配列を複製してテンプレート配列の非同一な複製物に該類似体を組込むようにするための手段と、この方法を行なうための使用説明書とを含む。好都合には、テンプレート配列を複製するための手段はポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を行なうための手段を含む。キットは8-オキシdGTPおよび／またはdKTPおよび／またはO²-エチルチミジン三リン酸をさらに有利に含み得る。

別の局面において、本発明は以下の構造を有する化合物を提供する。



式中、 $Y^1 = OH$ 、 O -アルキル、 NH_2 または N （アルキル） $_2$ であり、 Y^2

$= H$ 、または NH_2 であり、 $Y^3 =$ 三リン酸（ P_3O_9 ） $^{4-}$ 、二リン酸（ P_2O_6 ） $^{3-}$ 、チオ三リン酸（ P_3O_8S ） $^{4-}$ またはそれらの類似体であるが、 H ではなく、さらに $Y^4 = H$ 、 NH_2 、 F または OR であり、ただし R は任意の基であってよいが、好ましくは H 、メチル、アリルまたはアルカリールである。

好ましい実施例において、 Y^1 は OCH_3 であり、 Y^3 は三リン酸であり、さらに Y^4 は H または OH である。好ましい実施例の特定の例は、ヌクレオチド類似体 dKTP である。本発明の化合物は、特にヌクレオチド類似体として、予期されなかった特性およびさまざまな応用の可能性を有する。化合物はたとえば、本発明の第2の局面に関連して先に説明したものに類似する、突然変異誘発法に用いることができ、その好ましい特徴は一般的にいずれの方法にも共通する。

さらなる局面において、本発明は、少なくとも1つの塩基類似体を含むDNAまたはRNA配列をインビトロで生成させるための方法を提供し、この方法は、適当な条件において、4つの正常なdNTP（またはrNTP）および本発明による新規なヌクレオチド（またはリボヌクレオチド）三リン酸類似体を含む混合物を、テンプレート核酸鎖の存在下でDNA（またはRNA）ポリメラーゼによって処理し、それにより、少なくとも1つの類似体を含むヌクレオチド（またはリボヌクレオチド）の配列を形成するようにする。

次に、添付の図面を参照しつつ、例を示すことにより、本発明をより詳細に説明する。図面において、

図1は、さまざまな化合物1-6の構造式を示す図である。

図2は、アデニンおよびグアニンとのPの塩基対合を概略的に示す図であり、塩基対合の両義性有力なトランジション突然変異誘発効果の基礎を部分的にしている。

図3Aおよび図3Bは、Taqポリメラーゼによる、dPTP (A) および8-オキシdGTP (B) の、DNAへの取込みおよび伸長を示す、PCR産物のゲル電気泳動の写真を示し、A) PCR反応混合物は、試料1においてdATP, dGTP, dCTP, TTPを含み、試料2においてdGTP, dCTP, TTP, dPTPを含み、試料3においてdATP, dGTP, TTP, dPTPを含み、試料4においてdCTP, TTP, dPTPを含み、試料5においてd

TP, dGTP, TTP, dPTPを含み、試料6においてdATP, dGTP, dCTP, dPTPを含み、試料7においてdATP, dGTP, dPTPを含み、試料8においてdATP, dGTP, dCTP, TTP, dPTPを含んだ。dPTPが1mMであった試料4および7を除いて、すべてのdNTPは500μMであった。

B) PCR反応混合物は、500μMのdATP, dCTPおよびTTPを含んだ。試料1から4はそれぞれ50μM, 25μM, 12.6μMおよび6.25μMのGTPを含有し、かつ500μMの8-オキシdGTPを含有した。試料5から8は同じようにdGTPの含有量を減らしていったが、8-オキシdGTPを含有しなかった。

図3Cは、4つの本来のdNTP (レーン1から4)、等モル濃度の4つの正常なdNTPおよびdPTP (レーン5から8) ならびに等モル濃度の4つの正常なdNTP、dPTPおよび8-オキシdGTP (レーン9から12) の存在下での、異なるターゲット遺伝子のPCRによる増幅を示す、ゲル電気泳動の写真である。テンプレートDNAは、ヒトクロファージ刺激タンパク質 (MSP) (レーン1、5および9)、ヒトコネキシン31 (レーン2、6および10)、ヒトコネキシン43 (レーン3、7および11) またはヒトCD3の鎖 (レ

ーン4、8および12)であった。フラグメントのサイズはキロベースで図の横側に示される。すべてのフラグメントはpBlue scriptにおいてクローン化され、標準T3およびT7プライマーを用いてDNA増幅が行なわれた。

図4は、12.5 μ M [32 P] dCTP, dATP, dGTPおよびTTP (白四角) またはdPTP (黒四角) の存在下でのDNA合成のタイムコースを示す。プライマーをつけられたM13mp18が、0.3 UのTaqポリメラーゼの存在下でのDNA合成のためのテンプレートとして用いられた。図4Bおよび図4Cは、12.5 μ MのdATP, dGTPおよび [32 P] dCTP、ならびに表示した濃度のdPTP (B) およびTTP (C) の存在下における反応の最初の80秒間のDNA合成速度を示す。

図5の上は、Aに対向するdPTP (A)、Aに対向するTTP (B)、Gに対向するdPTP (C) およびGに対向するdCTP (D) のTaqポリメラー

ゼによる取込みに関する [dNTP] に対する初期速度のプロット図である。下は、実験で用いられたプライマーおよびテンプレートである (Seq ID No.3-5)

。

図6は、PCRによる突然変異誘発の、異なったサイクルの後の標的DNAの突然変異の頻度を示す。4つの正常dNTPおよび類似体が等モル量 (500 μ M) で用いられた。

図7は、dPTP、8-オキシdGTPおよびそれら2つの混合物によって引き起こされた、突然変異のパターンを示す。異なった数のPCRサイクル後に得られたデータはプールされ、図は、突然変異の総数のパーセンテージを表わす。

図8は、12の個々のクローンの配列分析によって示されるように、標的DNA配列MH22 (Griffiths et al., 1994 EMBO J. 13, 3245-3260) 中のdPTPによって引き起こされたすべての点突然変異および関係アミノ酸の置換をまとめて示す。表の上方にある数は、その標的配列に、特定のコドンが存在する回数を示す。白四角は特定のコドン内の単一の点突然変異を示す。黒丸は特定のコドン内の2つの点突然変異を示す。コドン内に3つの塩基置換が見い出された場合はなかった。影付区域の四角はサイレント突然変異を示す。

図9は、8つの独立したクローンの配列分析によって（図8の凡例として）示されるように、標的DNA配列MH22において8-オキシdGTPによって引き起こされたすべて点突然変異および関係アミノ酸の置換をまとめて示すものである。* (C→A) で示された点突然変異は通常、8-オキシdGTPの誤対合から生じることが予期されないものである。

図10は、dPTP（丸）、8-オキシdGTP（四角）およびそれら2つの組合せ（三角）によって引き起こされるコドン変化を示す。黒い記号はコドン内の単一のヌクレオチド変化を示し、白い記号は同じコドン内の2つのヌクレオチド変化を示す。菱形は、予期されたものとは異なったヌクレオチド変化の存在を示す。アミノ酸はそれらの物理化学的な特性によって5つのクラスにグループ化され、これらのクラスとは、グリシン、非極性、極性、正に荷電および負に荷電である。星印は、研究された2つの標的遺伝子に存在していなかったコドンを示す。

図11は、PCR反応において4つの正常dNTPと等モル量（500 μM）で用いられた場合の、dPTP（A）、8-オキシdGTP（B）およびそれら

2つの混合物（C）によって引き起こされた、標的DNA配列MH22（点線内、Seq ID No.1、アミノ酸配列はSeq ID No.2）における突然変異と、対応するアミノ酸の置換（点線の上）とを示す。各配列の5' -末端における最初の数は、類似体（1種または複数種）の存在下で許容されたPCRサイクルの数を示す。2つ目の数は種々のクローンを特定する。

例1

dPTP、dKTPおよび8-oxodGTPの合成

PおよびKの5' -三リン酸エステル誘導体はLudwigによって説明されている一般的な手順によって調製された（Ludwig, Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung. 1981 16, 131）。8-オキシdGTPは（上記のMo et al.,）に記載のdGTPから調製された。陰イオン交換クロマトグラフィー（PおよびK）と、その後の逆相HPLC（P、Kおよび8-オキシG）とによる精製により三リン酸エステル試料が得られ、これは¹H NMR、³¹P NMRおよびHPLC

Cによって純粋であると判断された。

Taqポリメラーゼのための基質としてのdPTP、dKTPおよび8-オキソdGTP

350塩基対のDNA配列を増幅するようTaqポリメラーゼおよび30x (92℃、1分; 55℃、1.5分; 72℃、5分)のPCRプログラムを用いると、dPTPが完全にTTPを置換し、4つの正常三リン酸エステルを用いて得られたものに匹敵する量の生成物が得られ(図3A)、かつある程度dCTPを置換することができるとわかった。対照的に、dKTPはごく限られた程度しかdATPおよびdGTPを置換することができなかった(しかしながら所望レベルの突然変異誘発を引起こすにはこのような低レベルの置換で十分であろう)。8-オキソdGTPが用いられた場合、正常なまたは制限した量のdGTPを用い、かつより高い濃度の8-オキソdGTPで補うことにより、DNA中へのいくらかの取込みおよびその伸長を示すことができた。図3B(レーン1から4)は、500μMのdATP、TTP、dCTPおよび8-オキソdGTPへならびに(50μMから6.25μMまで)量を減らしていったdGTPを用いて得られたPCR生成物を示す。レーン5から8は、8-オキソdGTPが存在

しないときに同じ条件を用いて得られたPCR生成物を示す。

Taqポリメラーゼによる、dPTPの取込みの速度論

PCRに用いられる、酵素Taqポリメラーゼのための基質としてのdPTPの性能を評価するために、その取込み速度が分析され、TTPと比較された(これは、最初の実験により、その特性がこの本来の三リン酸エステルのもものと最もよく似ていることが示されたからである)。図4Aは、dATP、dCTPおよびdGTPにCTTPまたはdPTPを加えたものの存在下におけるDNA合成の速度を示す。DNA合成は、72℃において、プライマーをつけたM13テンプレートを用いて[α-³²P]dCTPを取込むことにより測定された。dPTPまたはTTPのいずれかが存在した場合、取込みは初めの80秒において線形的に増加した。異なった濃度の基質に関する取込み速度を計算するために、両三リン酸エステル誘導体が、線形の合成速度をもたらす区間上の時点が選択された

(図4 Bおよび図4 C)。濃度が高い場合、DNA合成の速度は時間とともに線形的に増加しなかったため、d P T Pには $50 \mu\text{M}$ より低い濃度を用いる必要があった(図4 B)。T T Pについては、経時的な取込み速度の、測定可能な差ができるようにするために、 $1.25 \mu\text{M} \sim 25 \mu\text{M}$ の濃度が用いられた(図4 C)。T T Pおよびd P T Pに関する見かけの K_m 値は、直接的な線形プロット法によって実験データを解析することにより決定された(Eisenthal and Cornish-Boaden, 1974 J. Biochem. 139, 715)。これらの実験条件下でのd P T Pに関する見かけの K_m は $22 \mu\text{M}$ であり、T T Pについては $9.25 \mu\text{M}$ であった。したがって、d P T Pに関する値は、4つの本来のd N T P [$14 \mu\text{M} - 17 \mu\text{M}$]に関する文献(Kong et al. 1993)において報告されているものに好都合に匹敵する。

テンプレートのアデニンおよびグアニン残基に対するd P T Pの挿入の、相対的な効率をそれぞれ比較するために、我々は、プライマーをつけた2つの合成オリゴヌクレオチドテンプレートのうち一方を用いて定常状態の速度論を決定すべく、Boosalis et al. (Boosalis et al., 1987 J. Biol. Chem. 262, 14689-14696)の処理法を採用した(図5)。各場合の ^{32}P 標識プライマーは、2つの位置におけるd G T Pの取込み、続いてd P T P(テンプレート1および2)、

T T P(テンプレート1)またはd C T P(テンプレート2)の取込みにより伸長された。PAGEによって生成物を分離し、その後PhosphorImagerを用いて放射活性の定量化を行なうことにより、初期速度の決定が可能になった(Boosalis et al., 1987)。Taqポリメラーゼの伸長速度は非常に高いため、 55°C で速度論的パラメータが測定された。テンプレートに対する特定の三リン酸エステルの挿入についての速度(V_{\max})および特定の挿入についての K_m 値(μM)は、ミカエリス・メンテンの式にあて嵌まる非線形回帰によって決定された。

v 対基質濃度 $[S]$ のプロットがそれぞれ図5 Aから図5 Dにおいて4つの可能性PA、TA、PGおよびCGに関して示され、速度論的パラメータおよび触媒効率(V_{\max}/K_m)は表1に示される。この結果は、Taqポリメラーゼによるその認識という点においてd P T PはT T Pと実質的に区別できないことを示

す。さらにそれは、テンプレートのグアニン残基よりもアデニン残基に対向してほぼ3倍効率よく取込まれた。

8-オキシdGTPについての K_m 値は、ここに記載したものに類似した処理法を使用する大腸菌DNAポリメラーゼIクレノウフラグメントを用いて報告されている(Purmal et al., 1994)。CおよびAに対向する挿入に関する63および58 μ Mの値がそれぞれ37℃で得られ、これらは、正常dNTPに関するおよそ1 μ Mの平均値に匹敵する(Purmal et al., 1994 Nucl. Acids Res. 22, 3930-3935)。また、この類似体は熱安定性Tth DNAポリメラーゼに対する基質となり、約1%の割合でA→Cトランスバージョンを引起こすことが示されている(Pavlov et al., 1994 Biochem. 33, 4695-4701)

表1

テンプレート	基 質	$V_{max}^{(rel)}$	K_m (μ M)	V_{max}/K_m (M^{-1})	相対的な 効 率
A	dPTP	0.86 ± 0.06	5.2 ± 1.5	16.5×10^4	0.99
G	dPTP	0.69 ± 0.08	12.1 ± 4.8	5.7×10^4	0.11
A	TTP	1.02 ± 0.11	6.1 ± 1.5	16.7×10^4	1.00
G	dCTP	1.01 ± 0.09	2.03 ± 0.68	49.8×10^4	1.00

dPTP、8-オキシdGTPおよびそれらの混合物によって誘発された突然変異頻度

dPTPまたは8-オキシdGTPがDNA合成反応に用いられた場合に生じる突然変異を調査するために、PCR反応が設定され、ここに4つの正常dNTPに等モル濃度でdPTPが添加された。DNAは種々のサイクル数で増幅され、組込まれた塩基の類似体を除去するため、増幅されたDNAのアリコートが、4つの正常dNTPのみを用いた第2のPCR増幅においてテンプレートとして用いられた。PCR生成物はその後クローン化され、クローンのうちいくつかは配列決定された(この方法で、突然変異のパターンは大腸菌宿主のDNA修復メカニズムによって影響を受けなかった)。図6は、等モル濃度の4つの正常dN

TPおよびdPTP (□)、または8-オキソdGTP (◇) またはdPTP + 8-オキソdGTP (○) の存在下で増幅されたDNAにおける、点突然変異の累積を示す。データは次の3つのことを意味する。すなわち、(i) PCRの30サイクル後には非常に高い突然変異頻度が得られ、これらの頻度は他の方法によって報告されているものよりも高い。(ii) 1つのクローンあたりの突然変異の数はサイクル数によって調節可能である(図6)。(iii) 2つの類似体の組合せが用いられた場合、突然変異収率は単独の場合よりも高い。

dPTP、8-オキソdGTPおよびそれらの混合物によって生成された突然変異パターン

ヌクレオシドdPおよび8-オキソdGの塩基対合の能力は異なるため(アデニンまたはグアニンとのdP対合(図2に示される上記のKong & Brown Nucleic Acids Res. 1989)およびアデニンまたはシトシンとの8-オキソdG対合(上記のPavlov et al., Kuchino et al., Nature 1987 327, 77; Monya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993 90, 1122))、本発明者は2つの類似体三リン酸エステルおよびそれらの組合せによって生ずるヌクレオチド変化を分析した。この結果は図7に示され、配列決定されたすべての突然変異のパーセンテージとして表わされる。図は、dPTPが4つのトランジション(A→G, T→C, G→AおよびC→T)を引起こすことを示す。2つのトランジション(A→GおよびT→C)は、他の2つのトランジション(G→AおよびC→T)よりも高い頻度で起こる。

これは、テンプレート配列におけるアデニンに対向するdPTPの挿入が優先する結果として生ずる。(図2に示されるように) Pの両面性塩基対合の能力により、dPTPの取込み時か、または取込み後のその複製のいずれかにおいて、トランジション突然変異が引起こされる。8-オキソdGTPは、いずれの鎖についてもTTPの代わりに取込まれ、続いて、これまで観察されたようにdCTPの挿入を導く結果、2つのトランスバージョン(A→CおよびT→G)を引起こす(Pavlov et al., Mo et al., and Kuchino et al., すべて上述したもの)。単一のDNA合成反応において両類似体を用いることにより、同等の頻度での2つ

の塩基類似体によって突然変異が引起こされる。さらに、いくつかの付加的な突然変異（たとえばC→G）が観察される。dPTPおよび8-オキシdGTPによって誘発される、それぞれのタイプのヌクレオチド変化は、突然変異体のアミノ酸配列に、結果として効果を及ぼす。dPTPおよび等モル濃度の4つの正常dNTPの存在下で得られた12の突然変異体クローンの配列決定は、テスト配列中に存在する43個のコドンのうち40個が、代替的なものに突然変異したことを示した（図8）。8-オキシdGTPおよび等モル濃度の4つの正常dNTPの存在下で得られた8つの突然変異体クローンの配列は、18個のコドンが置換されたことを示した（図9）。注目すべきことは、両方の類似体がいずれも、ある点突然変異を引起し得る一方、他の突然変異は、dPTPおよび8-オキシdGTPの両方が存在することによってのみ引起こされ、そのことは、ヌクレオシド類似体の三リン酸エステル誘導体の適当な混合物の使用が、ランダムな突然変異をDNAに導入するための有力な手法になることを示しているということである（図11）。

図11は、下記の等モルヌクレオチド混合物が用いられた場合の、一連の突然変異誘発実験の結果を示す。すなわちこれらの等モルヌクレオチド混合物とは、4つの正常dNTPおよびdPTP（図11A）と、4つの正常dNTPおよび8-オキシdGTP（図11B）と、4つの正常dNTP、dPTPおよび8-オキシdGTP（図11C）とである。第2の標的遺伝子に、同様な実験を行ない、同様な結果が得られた（データは図示せず）。図11に示されるように、クローンの指定符号において点の前にある数の、種々のサイクル数でDNA増幅反

応を行なった。データより、テストされた3つの実験条件下で、かなりの数の点突然変異が標的遺伝子に引起こされたが、dPTPは8-オキシdGTPよりもはるかに効率の良い突然変異原であることが明らかになった。データはまた、DNA増幅反応に用いられたサイクル数の関数として突然変異数が増加したことを明らかにしている。突然変異の頻度をPCRサイクル数に対してプロットした場合（図6）、少なくとも30サイクルまでは、8-オキシdGTP、およびdPTPと8-オキシdGTPとの混合物に関する場合の両方において線形的な関係

が明らかになった。dPTPの場合、この関係は初めの20サイクルについて線形的であった。より小さいサイクル数の場合、2つの三リン酸エステル類似体の組合せでは、dPTP単独によって起こされたものよりも明らかに突然変異の総数が小さかったが、このような反応において生成されたDNAにはdP-誘発突然変異および8-オキシdG誘発突然変異の両方が含まれた（以下参照）。

異なった数のPCRサイクル後に配列決定されたクローンが別々のPCR反応物から得られたが、特定の位置における塩基が他のものよりより頻繁に突然変異されたことに注目すると興味深い。ただし、突然変異は明らかに遺伝子配列全体にわたって累積するようである。

クローン化挿入物において配列決定された塩基およびdPTP、8-オキシdGTPおよびそれらの組合せによって起こされた突然変異の合計数は表2に示される。dPTP、8-オキシdGTPおよびそれらの組合せによって起こされた突然変異のパターンは図7に示される。したがって、dPTPによって起こされた突然変異のうち、46.6%ではA→Gであり、35.5%はT→Cであり、G→Aは9.2%であり、C→Tは8%であった。主な突然変異事象（A→GおよびT→Cトランジション）は、いずれの鎖においても、Aに対向するdPTPの取込みが優先し、組込まれたPとGとがその後対になることから起こされる。より短い伸長物では、いずれの鎖においても、Gに対向するdPTPの取込みおよびその後のPとAとの対合（G→AおよびC→Tトランジション）がさらに起こる。上記の4つのトランジションに加えて、配列決定された4093bpから、1つのT→Gおよび2つのA→Tトランスバージョンが見い出された（図7参照）。

表2

PCRにおいてdPTPおよび8-オキシdGTPを用いて起こされた突然変異の数およびタイプ

突然変異誘発dNTP	配列決定された塩基数	点突然変異の数		
		合計	コード	サイレント
dPTP	4093	384	318	66
8-oxodGTP	5463	91	65	16
dPTP & 8-oxodGTP	3751	387	334	53

8-オキソdGTPによって生成された突然変異体では、2つのタイプのトランスバージョン突然変異、すなわちA→C (38.8%) およびT→G (59%) が存在した。これらはいずれのテンプレート鎖においても、Aに対向する8-オキソdGTPの誤った取込みにより誘導される (Shibutani et al., 1991 Nature 349, 431-434)。配列決定された5463bpから1つのC→Aトランスバージョンが見い出された。この突然変異は、テンプレートにおけるCに対向する8-オキソdGTPの取込み、その後の複製時におけるテンプレート8-オキソdGに対向するdATPの誤った取込みによって引き起こされたと考えられる。8-オキソdGTPに関するこの突然変異原性のメカニズムは、8-オキソdGTPが完全にdGTPを置換したときに起こるとしてこれまで報告されている (Cheng et al., 1992 J. Biol. Chem. 267, 166-172)。ごく小数の付加的な突然変異も見い出され、これらは2つのA→Gトランジションおよび1つのG→Aトランジションであった。

dPTPおよび8-oxodGTPをともに組合せることによって突然変異誘発されたクローンから、これらの条件下で観察された突然変異のパターンを図9に示す。2つの三リン酸エステル類似体の組合せから予期されたすべてのタイプのトランジションおよびトランスバージョン突然変異が観察されたが、それらのそれぞれの頻度は、dPTPおよび8-オキソdGTP突然変異の、組合せた頻度に基づいて予測されたものとはわずかに異なった。2つの類似体の混合物は、付加的な突然変異の頻度をさらに増加させた (1×10^{-3})。

配列決定された合計13,307bpについて両方の類似体を用いたところ、挿入および単一の2ヌクレオチド欠失は見い出されなかった。

dPTPによって誘発された4つのトランジション突然変異および8-オキソ dGTPによって誘発された2つのトランスバージョン突然変異の効果をコドンレベルでさらに分析した。図10はこの分析結果を示す。図は、アミノ酸を5つのクラス、すなわちグリシン、非極性、極性、正に荷電および負に荷電に分類し、dPTP突然変異誘発（丸）、8-オキソ dGTP突然変異誘発（四角）およびそれらの組合せ（三角）から得られたコドン変化を示す。単一の塩基置換から生じたコドン変化は黒い記号で示され、二重置換によって生じたコドン変化は白い記号で示される。

dPTPおよび8-オキソ dGTPによって誘発された突然変異における明らかな偏りにもかかわらず、これらの類似体またはそれらの組合せの使用により、広範なコドン変化の達成が可能になった。モデルテンプレートとして用いられた2つの遺伝子には、可能な64個のコドンのうち51個が含有された（いずれの遺伝子にも存在しないコドンは図10において星印が記されている）。存在する51個のコドンのうち50個は、dPTP、8-oxo dGTPまたはそれらの組合せによって突然変異された。

データベースに1回以上見い出された224個のコドン変化のうち、49個はサイレントであり、66個は同じクラスの別のものにアミノ酸を変化させ、105個は異なったクラスのうちの1つにアミノ酸を変化させ、4個は終止コドンになった。

したがってこれらの結果は、dPTPおよび/または8-オキソ dGTP突然変異誘発によって広範囲のアミノ酸置換を引起し得ることを示す。

実験の詳細

6-(2-デオキシ-β-D-エリトロペントフラノシル)-3,4-ジヒドロ-8H-ピリミド-[4,5-c][1,2]オキサジンを7オン5'-三リン酸、トリエチルアンモニウム塩(dPTP)(構造2)

54mgの0.2モルのPヌクレオシド(上記のKong Thoo Lin & Brown 1989)を80℃でP₂O₅によって真空下で一晩乾燥し、その後、アルゴン下で乾

燥トリメチルホスフェート(0.5mL)中に懸濁した。氷浴中でフラスコを冷

却し、塩化ホスホリル ($21 \mu\text{L}$) を攪拌しながら注入した。氷浴中で45分間攪拌した後、ビストリブチルアンモニウムピロホスフェートの攪拌混合物 (無水DMF中で0.5M、1.0mL) (Ludwig & Eckstein J. Org. Chem. 198, 54, 631)、トリブチルアミン (0.2mL) および無水DMF (0.4mL) を迅速に攪拌しながら氷中において加え、10分後に、重炭酸トリエチルアンモニウム溶液 (pH 7.5、0.1M、20mL) を加えた。1時間後に試料を水 (20mL) で希釈し、0.05Mの重炭酸トリエチルアンモニウム溶液を含有するセファデックスA25のカラム (直径25 x 330mm) にかけた。カラムには、4℃で直線的な勾配の重炭酸トリエチルアンモニウム溶液 (0.05 - 0.8Mの各々に対し1.5L) を流した。Pの5'三リン酸エステルは0.48M以上0.54M以下の緩衝液で溶出した。三リン酸エステルを含有するフラクションを合わせて蒸発させ、残渣をメタノールとともに蒸発させ、その後水 (10mL) 中に溶解させた。生成物は、Waters 7.8 x 300mmC18セミ分取カラムおよび0.1Mの重炭酸トリエチルアンモニウム pH 7.5中の直接的な勾配の0 - 4.5%のアセトニトリルを2.5mL毎分の流速で用いる、逆相HPLCによってさらに精製した。適当なフラクションを合わせて蒸発させ、残留緩衝液をメタノールとともに蒸発させて除去し、テトラキストリエチルアンモニウム塩として純粋な三リン酸エステルを得た。(pH 7において253A₂₆₀、0.067mモル、34%) δ (D₂O) - 9.57 (d, γ -P), -10.34 (d, α -P), -22.02 (t, β -P)。HPLCの保持時間は約18.5分であった。

2-アミノ-9-(2-デオキシ- β -D-エリトロペンチフラノシル)-6-メトキシアミノプリン5'-三リン酸、トリエチルアンモニウム塩。(dKTP) (構造4、ただしR' = NH₂)

29.6mg (0.1モル) のKヌクレオチド (上記のBrown & Kong Thoo Lin 1991) を80℃でP₂O₅によって真空中で一晩乾燥させ、その後アルゴン下で乾燥トリメチルホスフェート (0.25mL) 中に懸濁した。氷浴中でフラスコを冷却し、塩化ホスホリル (12 μL) を攪拌しながら注入した。氷浴中で7

0分間攪拌した後、ビストリブチルアンモニウムピロホスフェート（無水DMFにおいて0.5M、0.5mL）、トリブチルアミン（0.1mL）および無水DMF（0.2mL）の、よく攪拌された混合物（上記のLudwing & Eckstein参照）を迅速に攪拌しながら加え、7.5分後に重炭酸トリエチルアンモニウム溶液（pH 7.5、0.1M、5mL）を加えた。1時間後に、試料を水（30mL）で希釈し、0.05Mの重炭酸トリエチルアンモニウム溶液（pH 7.5）を含有するセファデックスA25のカラム（直径26×220mm）にかけた。カラムには、4℃において直線的な勾配の重炭酸トリエチルアンモニウム溶液（0.05–0.8Mの各々に対し1L）を流した。所望のKの5'三リン酸エステルを0.50M以上0.68M以下の緩衝液で溶出した。三リン酸エステルを含有するフラクションを合わせて蒸発させ、その後、残渣をメタノールとともに蒸発させ、水中（10mL）に溶解させた。生成物は、Waters7.8×300mmC18セミ分取カラムおよび0.1M重炭酸トリエチルアンモニウムpH 7.5中の直線的な勾配の0–4.5%アセトニトリルを用いる、逆相HPLCによってさらに精製された。適当なフラクションを合わせて蒸発させ、残留緩衝液をメタノールとともに蒸発させることにより除去し、テトラキストリエチルアンモニウム塩として純粋な三リン酸エステルを得た。（446A₂₆₀、pH 7、0.043mモル、43%） δ （D₂O）–10.37（d, γ -P）、–10.89（d, α -P）、–23.62（t, β -P）。HPLCの保持時間は約14.7分であった。

2'-デオキシ-8-ヒドロキシグアノシン5'-三リン酸、トリエチルアンモニウム塩（8-オキソdGTP）（構造5、ただしR' = NH₂）

この化合物は本質的に（上記の）Mo et al. に従って調製された。したがって、30mMのアスコルビン酸と100mMの過酸化水素とを含有する100mMのリン酸ナトリウム（8mL）中dGTP（三ナトリウム二水和物、58.48mg、96 μ モル）を37℃で4時間、暗所にてインキュベートした。生成物は、Waters 19×300mm C18分取カラムおよび0.1Mの重炭酸トリエチルアンモニウムpH 7.5中の直線的な勾配の0–15%アセトニトリル（流速7.5mL/分）を用いて逆相HPLCによって直接的に精製した。適当なフラクションを

合わせて、蒸発させ、残留緩衝液をメタノールとともに蒸発させることにより除去し、テトラキストリエチルアンモニウム塩として純粋な三リン酸エステルを与えた。吸収スペクトルは、(上記の)Mo et al. およびWallace et al., (Nucleic Acids Res. 1994 22, 3930) によって説明されたものと同じであり、すなわち λ_{244} 、 λ_{293} 、pH 7、5.2 μ モル、5.4%であった。
 δ (D₂O) - 9.68 (d, γ -P), -10.46 (d, α -P), -22.40 (t, β -P)。HPLCの保持時間は約27.9分、dGTPは26.0分であった。

以上には、この発明の範囲内である特定の新規な化合物(dPTP)の合成方法に関する詳細な説明を記載した。ここに含まれる開示によれば、当業者にはこの発明の範囲内である他の化合物の合成方法も明らかにならずである。たとえば、dPのリボヌクレオチド均等物(rP)を調製するために、上記のジデオキシリボイル-2-デオキシリボシルクロリド化合物の代わりに、(溶解度を改善するために) トリアセチルリボフラノシルクロリドを用いて、(適当な出発原料を用いて) 本質的に同じ合成経路を採用することができる。

突然変異誘発

突然変異誘発実験では、0.5 μ Mの適当なセンスおよびアンチセンスポリマー、2mMのMgCl₂、10mMのトリス-HCl pH 8.3、50mMのKCl、1g/lのゼラチンならびにそれぞれ500 μ MのdATP、dCTP、dGTP、TTP、dPTPおよび/または8-オキシdGTPを含有する20 μ lの反応物において0.5 μ lのAmpliTaQポリメラーゼ(5 U/ μ l, Applied Biosystems)を用いて、10 fモルのテンプレートDNAを増幅した。さまざまなサイクル(92℃で1分間、55℃で1.5分間、75℃で5分間)後、反応混合物にdPTPまたは8-オキシdGTPが加えられなかったことを除けば上記と同じ条件が用いられた第2のPCRにおいて、増幅された1 μ lの材料が用いられた。第2のPCRの生成物はBstEIIおよびPstIで消化され、M13VHPCR1ベクターにクローン化された(Jones et al., 1986 Nature 321, 522-525)。単ファージ分離物から調製された一本鎖DNAの配列分析は、製造者によるSequenase Version 2 (United States Biochemicals, Cleveland

OH) を用いて行なわれた。

例2

触媒活性が改善された酵素のランダムな突然変異誘発および選択

分子進化に向けられたインビトロの実験における、突然変異誘発法の可能性を調査するために、モデルシステムとして酵素TEM-1 β -ラクタマーゼを用いた。

β -ラクタマーゼは、 β -ラクタム環の加水分解を触媒し、かつ不活性生成物を生成させることにより、アンピシリンおよびセファロスポリンなどの β -ラクタム抗生物質に対する細菌の耐性に寄与する。TEM-1は、機能を改善するための非常に効率のよい化学的選択を適用することができるため、特に魅力的なモデルシステムである。このため、該モデルは、スクリーニング/選択法の不十分な分解能によって制限されることなく、突然変異誘発法自体の能力を評価できるようにする。

この実験では、ランダムな突然変異誘発および抗生物質の濃度を増加させていく選択を繰返すことにより、加水分解されにくい基質であるセフォタキシム [最小阻害濃度 (MIC) = $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$] について、酵素TEM-1 β -ラクタマーゼの加水分解活性を向上させることに着手した。1回目を選択された最良の突然変異体は、より高濃度の抗生物質の存在下で、2回目の突然変異誘発および選択に供される。選択圧力を漸進的に増加することにより、TEM-1加水分解活性の効率が段階的に向上する。

プラスミドpBR322からの野生型TEM-1遺伝子は、4つの正常dNTPに加えてdPTPおよび8-オキソdGTPの存在下で、PCT増幅のためのテンプレートとして用いられた。生成された突然変異体のプールはベクターpBCKS+においてクローン化され、突然変異体のライブラリは電気穿孔法によって大腸菌に導入された。その後、形質転換された細菌は、増加する濃度の抗生物質セフォタキシム上で平板培養された。 $0.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ のMICよりも高い濃度のセフォタキシム上で増殖する細菌は、この基質について、加水分解活性

の向上したTEM-1の突然変異体を保持する。選択された突然変異体は配列決定法によって分析され、1回目の突然変異誘発および選択の結果は表3Aに示さ

れる。独立した、4つの変異体のライブラリ(lib A, lib B, lib Cおよびlib D)を生成させるために、異なったサイクル数の突然変異誘発PCTが用いられ、生成されたライブラリの各々は、選択されていないクローンの配列分析によって決定されるように、異なった頻度の突然変異(lib Aについては0.3%、lib Bについては0.3%、lib Cについては1.8%、かつlib Dについては6.3%)を特徴とした。各ライブラリのアリコート(〜5×10⁴cfu)は0.2μg/mlのセフトキシム(MICの10倍)上で平板培養され、37℃で24時間インキュベーションした後に平板を検査すると、いくつかのコロニー(>50コロニー/プレート)が現れた。表3Aは、これらの平板上で増殖した、選択されたクローンの配列分析の結果を示す。星印はサイレント突然変異を示し、アミノ酸の番号付けはAmbler et al. (Biochem. J., 1991 266, 3186)に従う。下線付の残基はリーダーペプチドに属する。選択されたクローンのうち多くは、サイレントおよびコード突然変異の両方を引きこす、複数のヌクレオチド置換を含む。興味深いことに、特定の位置(たとえばL21P、V23A、G238SおよびE240Gなどを参照)における突然変異は、個々に独立して生成されたライブラリにおいて数倍になることがわかった。

0.2μg/mlのセフトキシム上で増殖するコロニー数が多いことから、我々は、より高い濃度の抗生物質上で増殖し得る突然変異体を探し求めることにした。すべてのコロニーが平板からかき取られ、肉汁中で溶解し、各ライブラリからのアリコートが2μg/mlのセフトキシムを含有する培地で平板培養された。平板は37℃で24時間インキュベーションされ、その後コロニー増殖について検査された。選択されたクローンは配列決定され、結果は表3Bに示される。G238S突然変異を含んだものを除いてすべての突然変異体が配列決定された。唯一の例外は、R164S突然変異を含むクローンである。これらの突然変異はいずれも、セフトキシム上での加水分解活性が向上したことを示すTEM-1β-ラクタマーゼの天然分離物において見いだされたものである。クロー

ン6aは、G238Sに加えてR241HおよびD252G突然変異を含む。その酵素活性と、単一の突然変異G238Sの酵素活性とを比較すると、 $>20\mu\text{g/ml}$ 上で増殖するコロニーでは少なくとも10倍高いことがわかった。

A

0. $2\mu\text{g/ml}$ セフトキシム上で選択されたクローン

	3	15	21	23	164	192	199	202	206	207	208	215	218	233	234	238	240	241	251	252	253	254	266	280
wt	I	F	L	V	R	K	L	A	Q	L	I	K	G	A	K	G	E	R	L	D	G	K	T	A
1a																S								
2a																G								
3a																G						Q		
4a					P	A										S		*	N			A		
5a																G		*		*	Q	A		
1c	T	*					*	P	V	*	S	V	E	*	*									
2c		*	P	A												S		*	N			A		
3c		*	P	A												S		*	N			A	*	
1d																G								

B

$2\mu\text{g/ml}$ セフトキシム上で選択されたクローン

	3	15	21	23	164	192	199	202	206	207	208	215	218	233	234	238	240	241	251	252	253	254	266	280
wt	I	F	L	V	R	K	L	A	Q	L	I	K	G	A	K	G	E	R	L	D	G	K	T	A
6a																S		H		G				
7a																S								
1b																S								
4c																S								
5c						S																		
2d																S								

これらの予備的結果は、三リン酸エステル類似体を用いたPCTによるDNAのランダムな突然変異誘発が、改良された性能を示す変異体をその中から選択することが可能なタンパク質突然変異体の大きなプールを生成させるために有効であることを示す。我々が提案する方法では、非常に効率のよい多数の突然変異体を生成させ、突然変異の頻度の制御を可能にする。このため、うまく平均のライブラリサイズ内に入る比較的少数の変異体 ($\sim 10^5$) をスクリーニングするこ

とにより、改良された触媒活性を有する酵素突然変異体を選択することが可能であった。さらに、突然変異の頻度が制御でき、1つの遺伝子について1以上のヌクレオチド置換を平均して導入できるため、突然変異がTEM-1加水分解活性の効率に協同作用を明らかに及ぼす三重突然変異体を、単一ステップの突然変異誘発および選択において分離することが可能になった。

考察

ここに記載したアプローチのさらなる開発を考える。第1に、単一により近い互変異性定数を示す、密に関連した類似体を生成させるdPTPの修飾は、4つの可能なトランジション突然変異すべての間での均衡性を調節するであろう。2つ目は、dPTP（または関連する）類似体および8-オキソdGTPの両方が組合せられて用いる実験における、トランジション対トランスバージョン突然変異の比に関する。ここに報告した実験では、類似体はいずれも500 μ mの濃度で用いられたが、dPの取込みおよび／または伸長の速度を高めると、dP誘発突然変異の頻度は高まる。それらの速度論の違いを補償するようdPTPおよび8-オキソdGTPの濃度を調節した、突然変異誘発反応からは、同等の数のトランジションおよびトランスバージョンが得られるはずである。最後に、6つのトランスバージョン突然変異（C \rightarrow G, G \rightarrow T, T \rightarrow A, A \rightarrow T, C \rightarrow AおよびG \rightarrow C）はいずれもdNTP混合物によって引き起こされることはなく、さもなければそれらは非常に低い頻度で引き起こされることが明らかである。したがって、低頻度にもかかわらずA \rightarrow Tトランスバージョンを誘発する、O²-エチルチミン三リン酸などの他の類似体（Singer et al. 1989）を、トランスバージョン突然変異の範囲を拡張するために用いることができよう。

インビトロでの点突然変異誘発の後に選択を行なうことは、明らかにタンパク質進化の重要な局面を模倣することを目的としているが、タンパク質工学の本来の戦略は、遺伝子挿入、欠失、複製および組換えといったさまざまな他のプロセスにも等しく依存することが明らかである。インビトロでこれらの事象を再発生させ、タンパク質工学の可能性を活用することを目的とする手法が開発中である。このような手法の1つでは、DNアーゼ処理によって得られる遺伝子フラグメ

ントが、ランダムな組換えを促進するプロセスにおいてPCRによって再度組立てられる (Stemmer, 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10747-10751)。

このアプローチの有効性は、 β -ラクタマーゼ突然変異体の工学にそれを応用することにより明らかに示されており、これらのうち1つは、大腸菌において発現されるときに、野生型酵素と比較して、最小阻害濃度における32,000倍の増加を示した (Steinmer 1994 Nature 370, 389-391)。しかしながら、野生型酵素と

比較すると、改良した突然変異体の配列には5つの点突然変異しか含まれなかったことが興味深い。このことは、Stemmerのプロトコルにはかなりの割合の点突然変異誘発が伴い、少なくとも β -ラクタマーゼの例では、このような点突然変異が、真の組換えの不在下で酵素の突然変異にもつばら寄与することを示している。それにもかかわらずこの結果は、点突然変異誘発がインビトロでのタンパク質工学に関する有力なアプローチであるという概念を強化し、点突然変異誘発を組合せた組換えが、一連の相同遺伝子から新しいタンパク質を作り出すために特別な可能性を有し得ること示唆する。

典型的に、これまでのDNA突然変異誘発プロトコルでは、比較的低い突然変異率しか得られなかった。しかしながら、ここに記載した処理法では、30サイクルのDNA増幅後に5分の1に近いヌクレオチド置換の頻度をもたらし得る。これは明らかに、タンパク質工学にとっての最適突然変異積載量について収穫である。

効率のよいランダム突然変異誘発プロトコルの下限を、平均して1つの配列につき1つのアミノ酸変化を導入することに設定することができ、これは適当に最適状態を下回るものとしてもよいという提案は妥当なものと思われる。同時に起こる置換数が非常に大きいと、タンパク質の安定性が明らかに破壊される一方、いくつかのモデルシステムによる研究は、比較的少ないアミノ酸位置が機能および安定性に決定的に重要であることを示唆している。

たとえばT4リゾチームにおいて、(イニシエータメチオニン以外の)各アミノ酸を、13種類の異なったアミノ酸で置換しても、半分より多くの位置がすべ

ての置換を許容したことがわかった (Rennell et al., 1991 J. Mol. Biol. 222, 67-87)。さらに、2015個の突然変異のうち、深刻に有害なものは173個しかなく、これらは163個の位置のうち53個に限られた (Rennell et al., 1991) さらに、スリプレスサーの研究により、タンパク質のコアにおける多くの置換が許容されることが示された (Lim et al., 1991 J. Mol. Biol. 219, 359-376)。

これらの研究は、多重ランダム突然変異の効果を直接的に取扱うものではないが、タンパク質機能が必ずしも損なわれるものではないことを示唆し、議論は、

抗体遺伝子の体細胞高度突然変異の研究結果によって補強される。二次または三次応答において分離された抗体にはかなりの数の置換突然変異が含まれる (Berek & Milstein 1987 Immunol. Rev. 96, 23-41参照)。個々の置換の役割が分析される場合、ごくわずかな突然変異がアフィニティー突然変異の役割を果たしていることが明らかになった (たとえば抗p-アゾフェニルアルソナート抗体における19個のアミノ酸のうち3つ) (Sharon 1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4814-4817) が、それでもVHおよびVLドメインは10分の1に近い置換率を許容するようである。

ここに記載した処理法はタンパク質工学のための最適な突然変異積載量を実験で取り扱えるようにし得る。なぜなら、これは今回容易に制御可能となり、異なった数の置換を保有するタンパク質突然変異体のライブラリを構成することができるからである。これらの研究はタンパク質工学に関する突然変異誘発/選択アプローチの可能性の探究に役立つはずである。

最後に、この発明と、コンビナトリアルオリゴヌクレオチド化学との関連性について触れる。後者においては、一般的に配列含量の大きな (たとえば4ⁿ) 多種多様の短い (n) レパートリが合成され得る。実質的に、すべての可能な配列の異性体が形成され、対象とする配列を特定するよう、さまざまなフォーマットにおいて、有効な回数だけ選択を行なう必要がある。典型的に、本発明のアプローチでは、可変性の突然変異圧下で、既に機能的であるDNA配列が増幅され、その後生成物がクローン化される。PCRサイクル数に関連するものとして観察

された突然変異の頻度は数十個のランダムに拾われたコロニーからのものであった。これらの突然変異頻度はおそらく、挿入物を保持するすべてのクローンに当てはまる。したがって、配列決定される突然変異体挿入物の数は、各増幅プロセスにおいて形成された合計のうちごく小さな部分になる。大きな合成レパートリとともに用いられるものに類似する慣用的な選択方法は、上記の問題に対するこの発明の利用可能性を明らかにするはずである。

配列リスト

(1) 一般的な情報

(i) 出願人:

- (A) 名称: Medical Research Council
- (B) 番地: 20Park Crescent
- (C) 都市: London
- (E) 国名: United Kingdom
- (F) 郵便番号: W1N 4AL
- (G) 電話番号: (0171) 636 5422
- (H) ファックス番号: (0171) 323 1331

(ii) 発明の名称: 核酸の突然変異誘発におけるまたはそれに関する改良

(iii) 配列数: 5

(iv) コンピュータによって読取り可能な形式:

- (A) 媒体タイプ: フロッピーディスク
- (B) コンピュータ: IBM PC互換性
- (C) オペレーティングシステム: PC-DOS/MS-DOS
- (D) ソフトウェア: PatentIn Release #1.0. Version #1.30 (EP0)

(2) SEQ ID NO: 1に関する情報

(i) 配列の特徴

- (A) 長さ: 285塩基対
- (B) 型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 線状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 1:

GAGTCTGGAG GAGGCTTGAT CCAGCCTGGG GGGTCCCTGA GACTCTCCTG TGCAGCCTCT	60
GGGTTCACCG TCAGTAGCAA CTATATGAGC TGGGTCCGCC AGGCTCCAGG GAAGGGGCTG	120
GAGTGGGTCT CAGTTATTTA TAGCGGTGGT AGCACATACT ACGCAGACTC CGTGAAGGGC	180
CGATTCACCA TCTCCAGAGA CAATTCCAAG AACACGCTGT ATCTGCAAAT GAACAGCCTG	240
AGAGCTGAGG ACACGGCCGT GTATTACTGT GCAAGAAAGT TTCCT	285

(2) SEQ ID NO: 2に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 95 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 線状

(ii) 分子の型: ペプチド

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 2:

Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser
 1 5 10 15
 Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val
 20 25 30
 Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser
 35 40 45
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 50 55 60
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Phe Pro
 85 90 95

(2) SEQ ID NO: 3に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 23 塩基対

(B) 型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 線状

(xi) 配列の記載: SEQ ID NO: 3:

GGCCTTGATA TTCACAAACG AAT 23

(2) SEQ ID NO: 4に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ: 30 塩基対

(B) 型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：線状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：4：

TCTTACCATT CGTTTGTGAA TATCAAGGCC 30

(2) SEQ ID NO：5に関する情報

(i) 配列の特徴

(A) 長さ：30塩基対

(B) 型：核酸

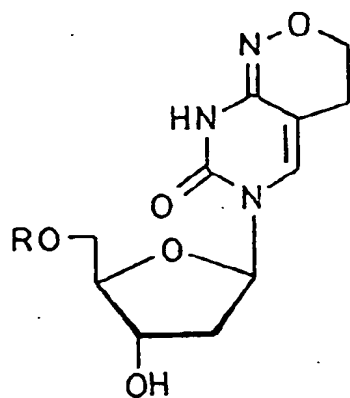
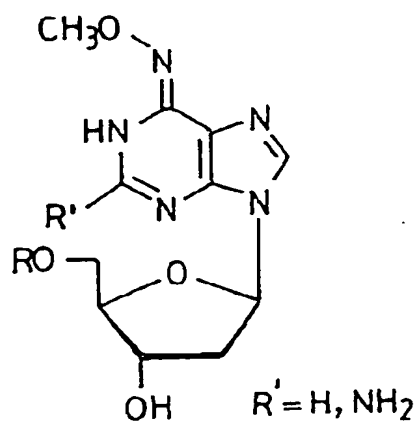
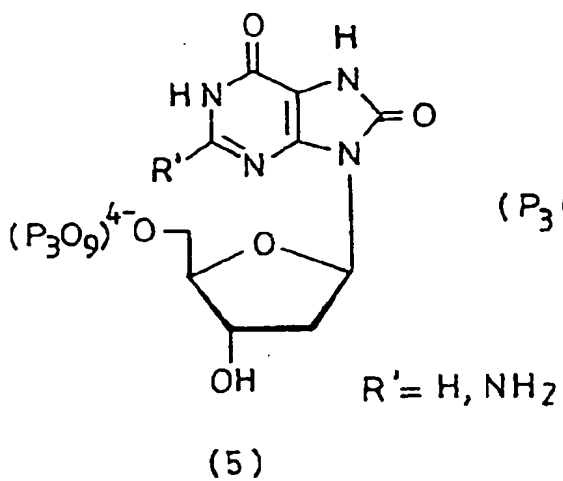
(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：線状

(xi) 配列の記載：SEQ ID NO：5：

TCTTGCCATT CGTTTGTGAA TATCAAGGCC 30

【図1】

(1) $R = H$ (2) $R = (P_3O_9)^{4-}$ (3) $R = H$ (4) $R = (P_3O_9)^{4-}$ 

(5)

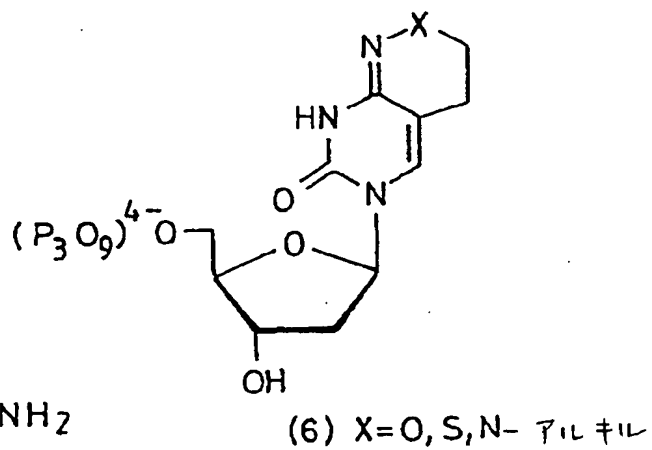
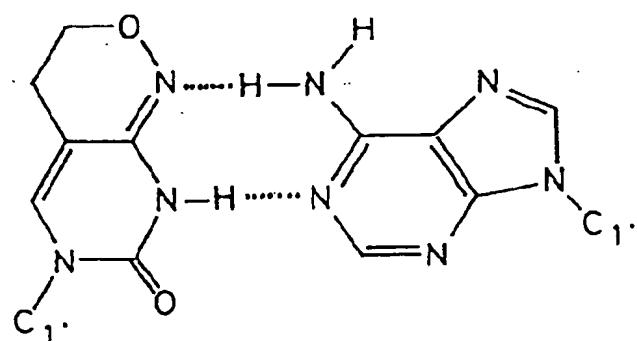
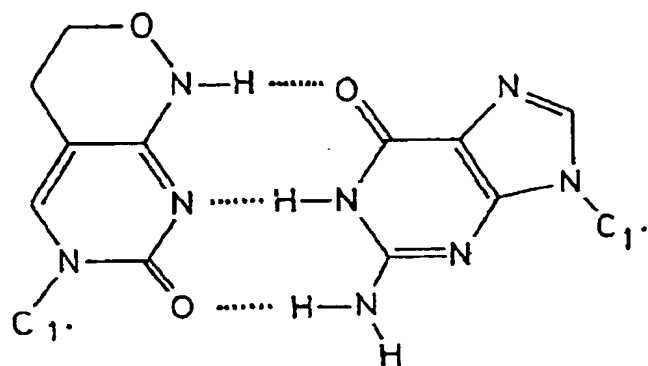
 $R' = H, NH_2$ (6) $X = O, S, N$ -アールキル

Fig. 1

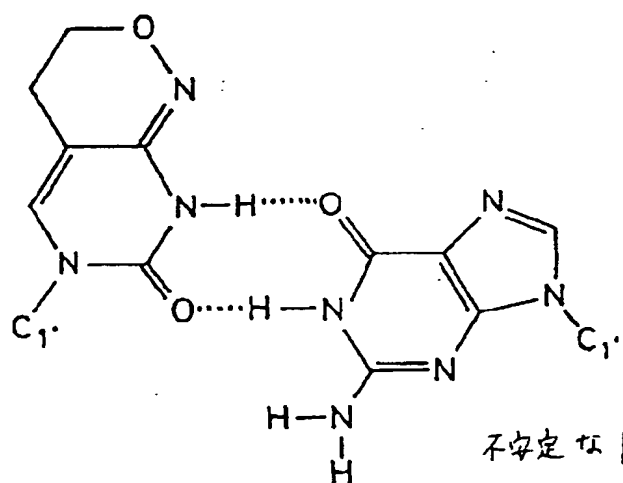
【図2】



P-1 (A)



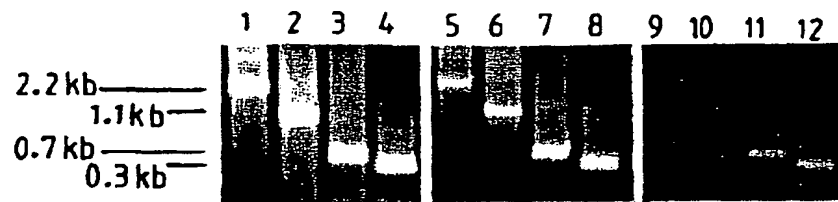
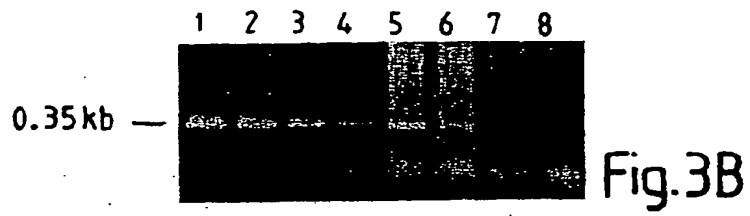
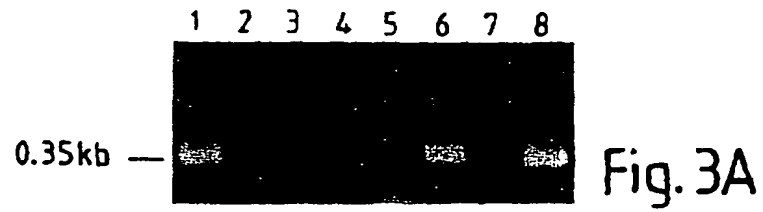
P-7 (G)



不安定な P-1 (G)

Fig. 2

【図3】



【図4】

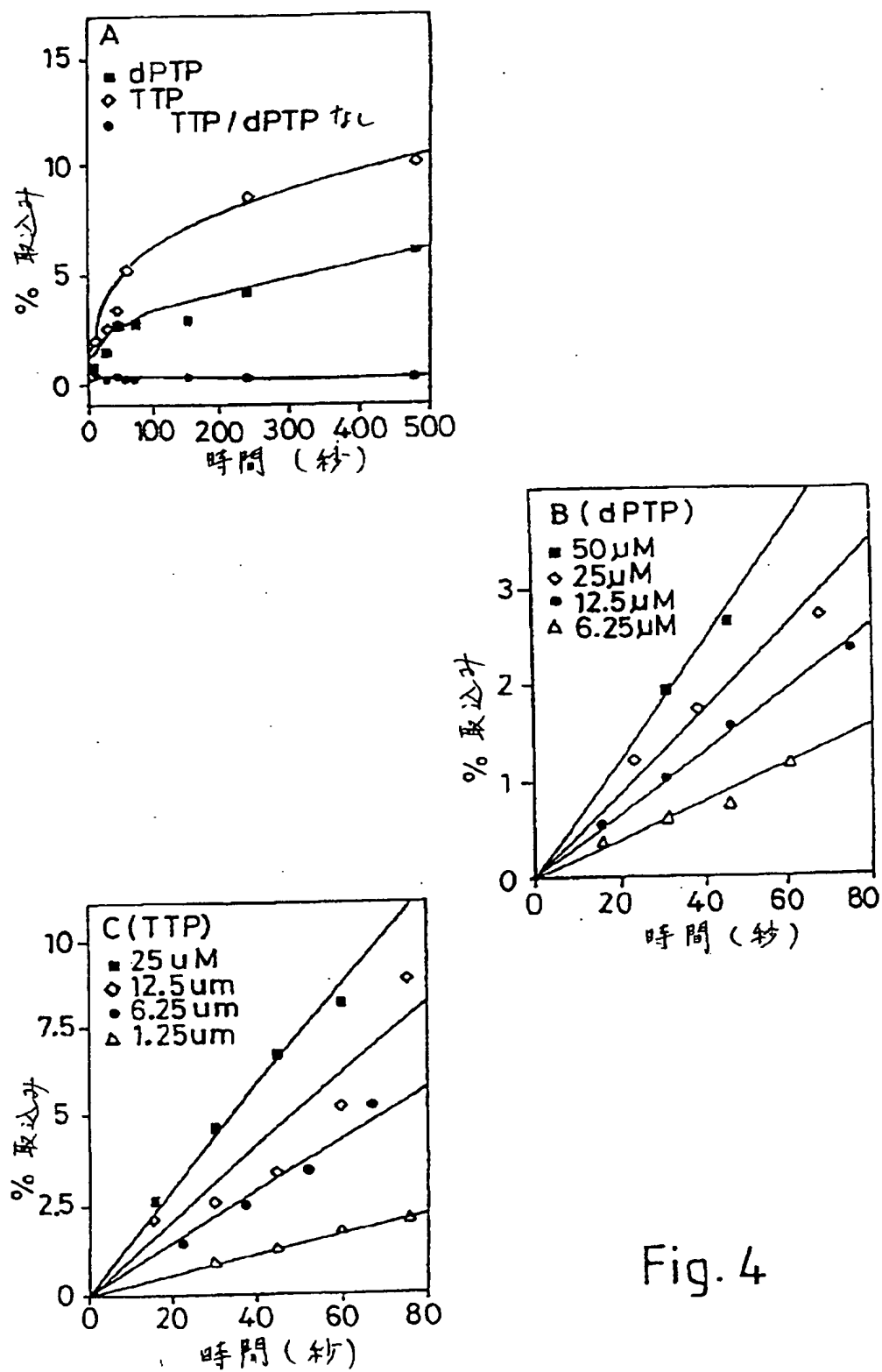
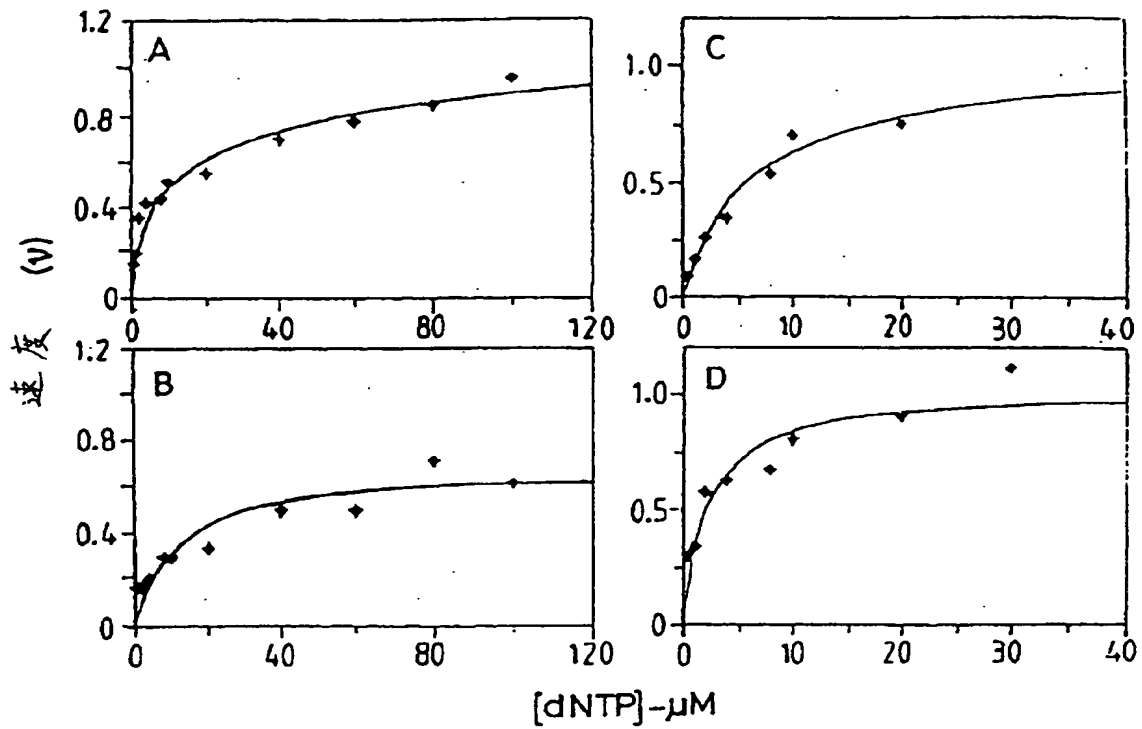


Fig. 4

【図5】



¹
 5'-d(GGCCTT GATATTCACAAACGAAT)²³
 3'-d(CCGGAAC TATAAGTGT TGGCTT ACCATTCT)¹²³
 3'-d(CCGGAAC TATAAGTGT TGGCTT ACCGTCT)

3' プライマー
 5' テンプレート 1 (dPTP/dTTP)
 5' テンプレート 2 (dPTP/dCTP)

Fig. 5

【図6】

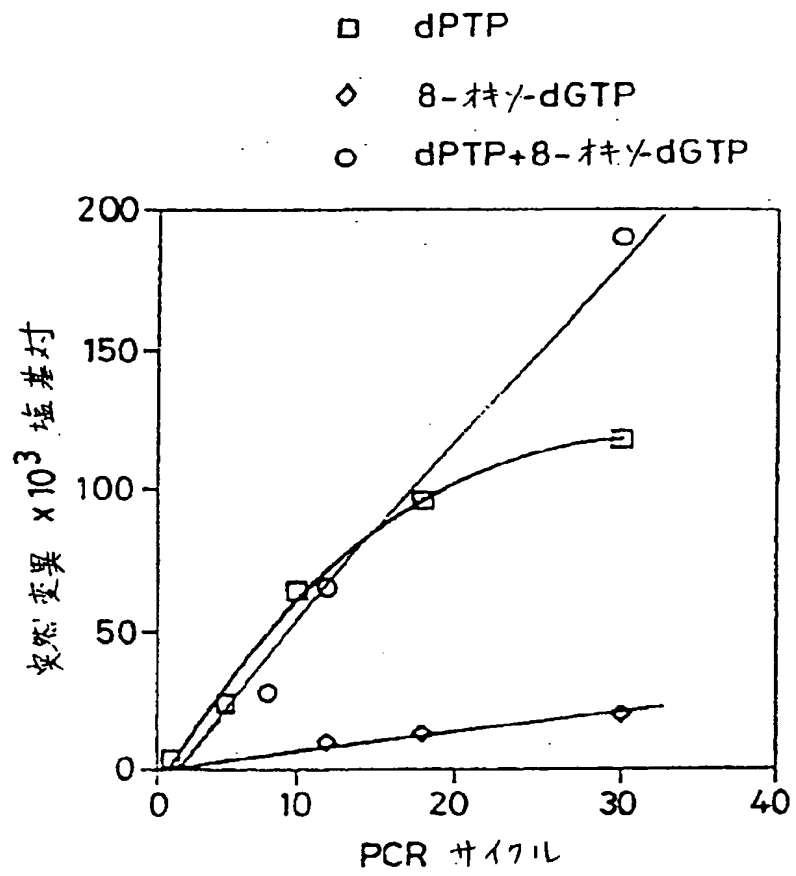


Fig. 6

【図7】

dPTP				
$\frac{t_{\text{to}}}{\text{from}}$	G	A	T	C
G	-	9.2	0	0
A	46.6	-	0.5	0
T	0.2	0	-	35.5
C	0	0	8.0	-

8- $\frac{t_{\text{to}}}{\text{from}}$ dGTP				
$\frac{t_{\text{to}}}{\text{from}}$	G	A	T	C
G	-	1.1	0	0
A	0	-	0	38.8
T	59	0	-	0
C	0	1.1	0	-

dPTP+8- $\frac{t_{\text{to}}}{\text{from}}$ dGTP				
$\frac{t_{\text{to}}}{\text{from}}$	G	A	T	C
G	-	7.8	0	0
A	40.7	-	0.2	6.6
T	1.8	0	-	37.6
C	0.7	0	5.4	-

Fig. 7A

Fig. 7B

Fig. 7C

【図8】

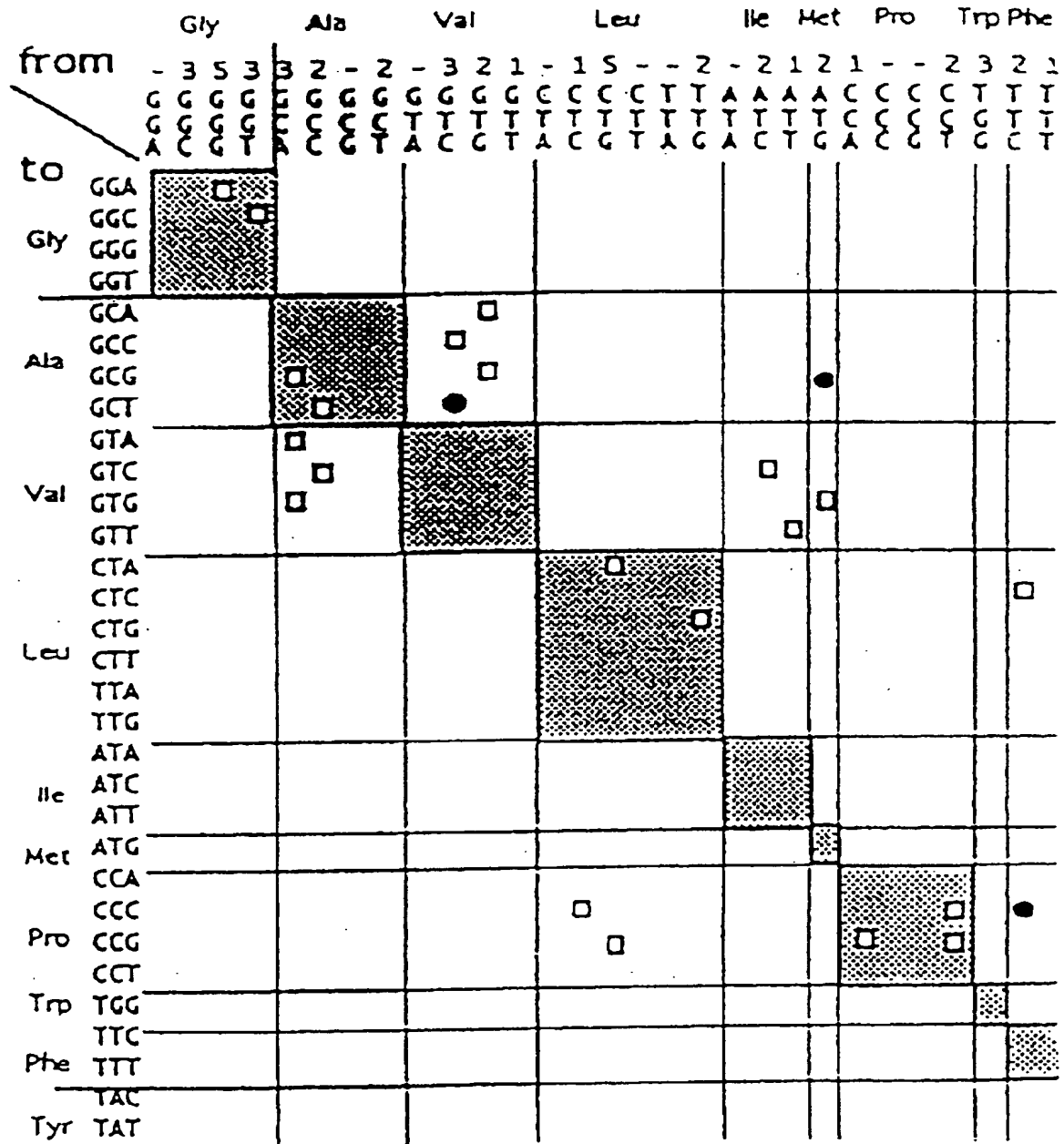


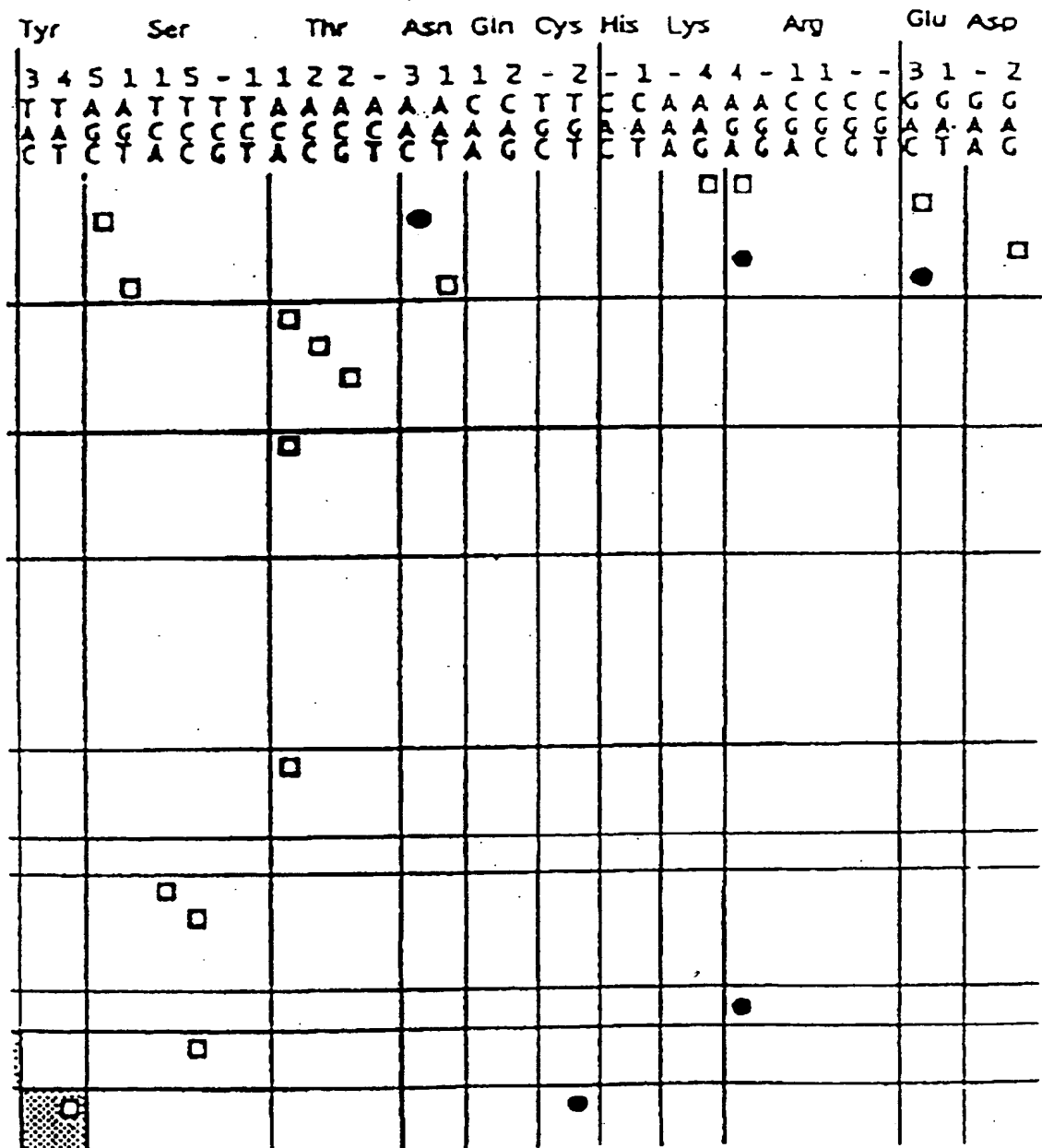
Fig.8 シート 3



Fig.8 シート 2 →

Fig.8 シート 1

【図8】



← Fig.8 シート 1

Fig.1 シート 4



Fig.8 シート 2

【図8】

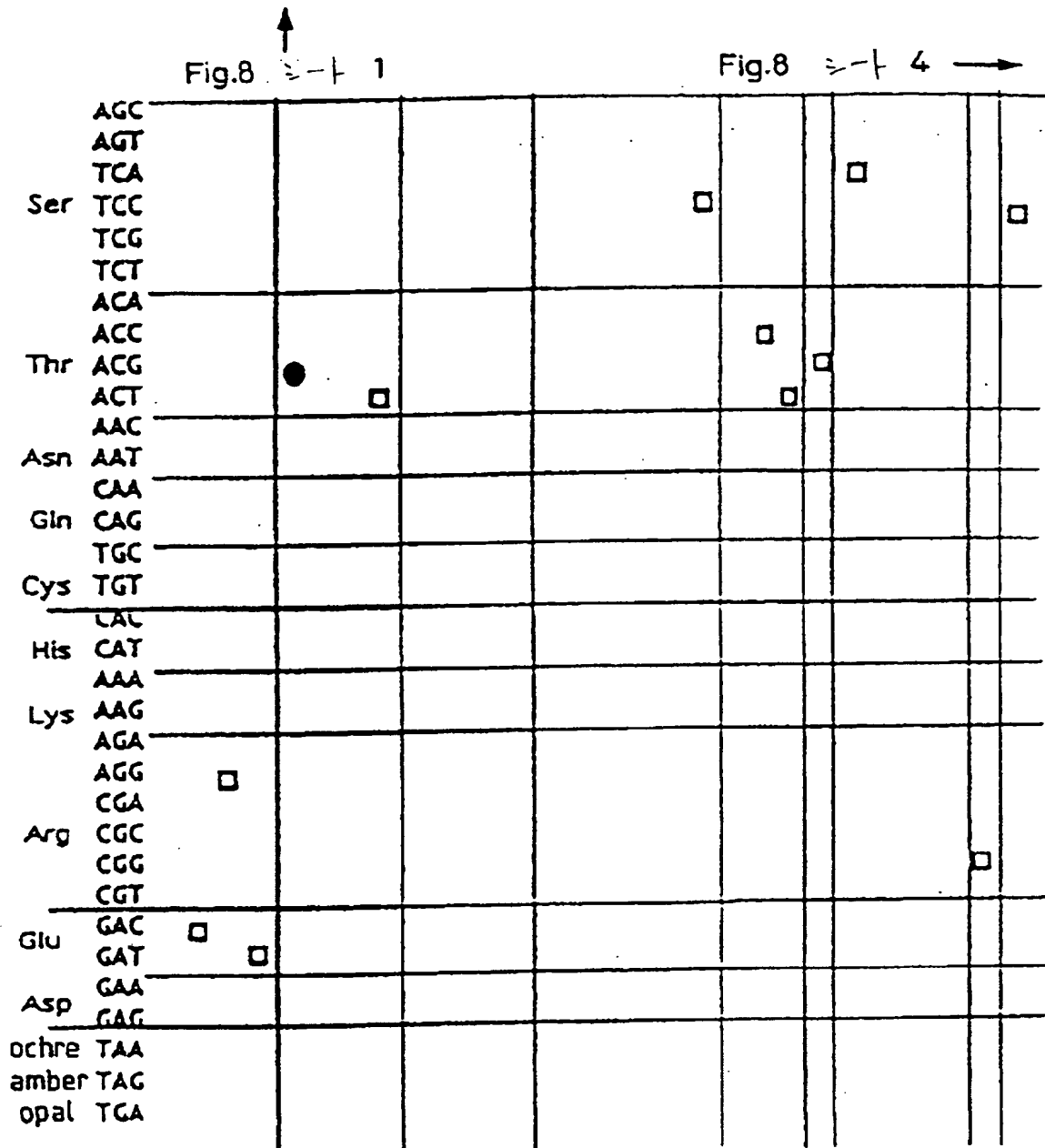


Fig. 8 シート 3

【図8】

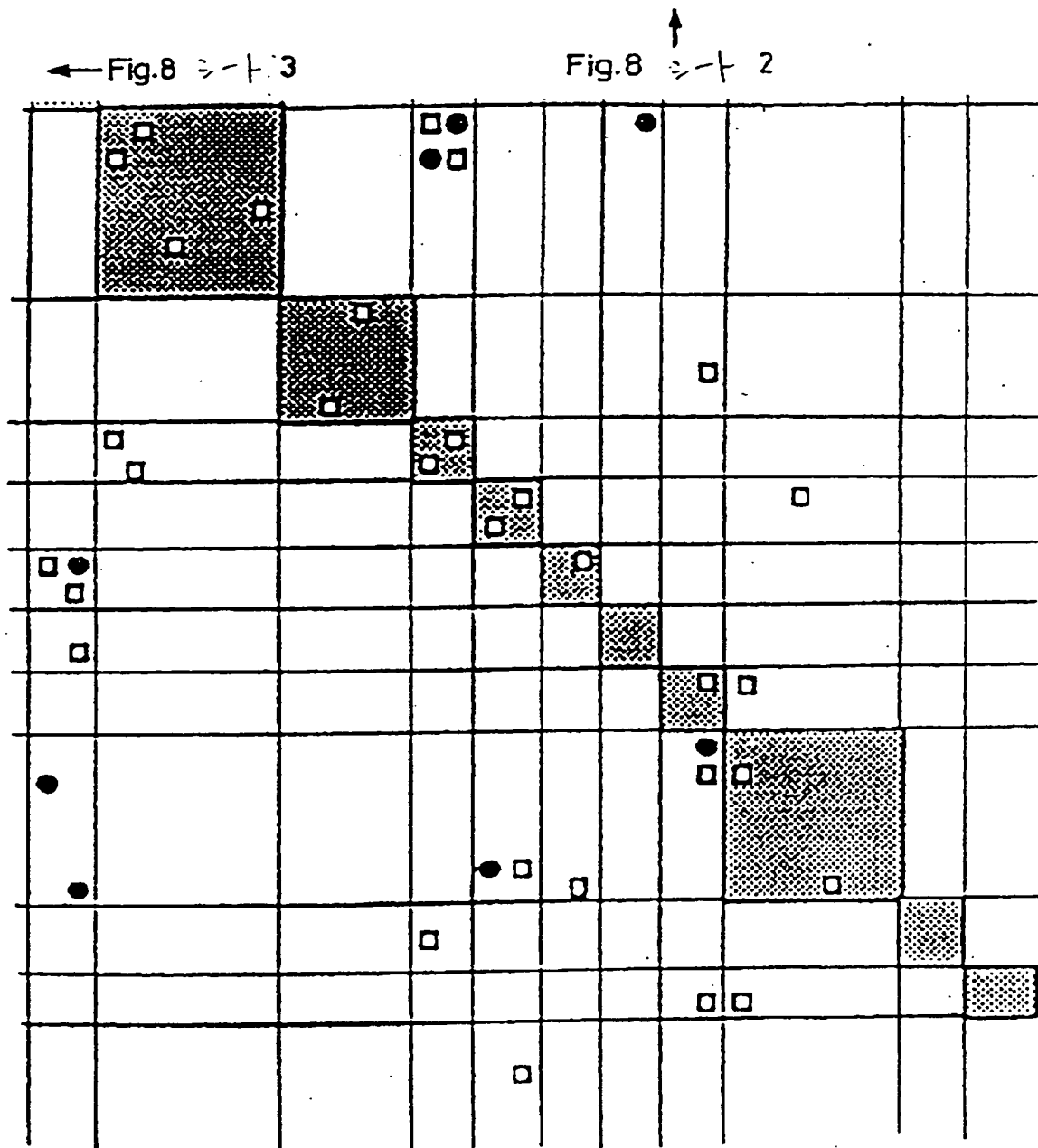


Fig. 8 シート 4

【図9】

		Gly				Ala				Val				Leu				Ile				Met				Pro				Trp				Phe				Tyr			
from		-	3	5	3	3	2	-	2	-	3	2	1	-	1	5	-	-	2	-	2	1	2	1	-	-	2	3	2	1	3	4	5								
		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C	C	C	C	T	T	A	A	A	A	C	C	C	C	C	T	T	T	T	T	A	A	C					
		A	C	C	T	A	C	C	T	A	C	C	T	A	C	G	T	A	G	A	C	T	C	A	C	C	T	G	C	C	T	C	T	C	T	C					
to	Gly	GGA	*																																						
	Gly	GCC																																							
	Gly	GGG																																							
	Gly	GGT																																							
Ala	GCA																																								
	GCC																																								
	GCG																																								
	GCT																																								
Val	GTA																																								
	GTC																																								
	GTG																																								
	GTT																																								
Leu	CTA																																								
	CTC																																								
	CTG																																								
	CTT																																								
Ile	TTA																																								
	TTG																																								
	ATA																																								
	ATC																																								
Met	ATT																																								
	ATG																																								
	CCA																																								
	CCC																																								
Pro	CCG																																								
	CCT																																								
	TGG																																								
	TTC																																								
Phe	TTT																																								

Fig.9 シート 3



Fig.9 シート 2 →

Fig. 9 シート 1

【図9】

← Fig.9 シート 1

Ser				Thr				Asn				Gln				Cys				His				Lys				Arg				Asp				Glu			
1	1	5	-	1	1	2	2	-	3	1	1	2	-	2	-	1	-	4	4	-	1	1	-	-	3	1	-	2	3	1	-	2							
A	T	T	T	T	A	A	A	A	A	A	C	C	T	T	C	C	A	A	A	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C							
G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	G	G	A	A	A	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G							
T	A	C	C	T	A	C	G	T	C	T	A	G	C	T	C	T	A	G	A	G	A	G	A	C	C	T	C	T	C	T	C	T	C						

Fig.9 シート 4



Fig.9 シート 2


Fig.9 

Fig. 9 $\approx 1.4 \rightarrow$

[illegible]

Fig. 9 Set 3

【図9】

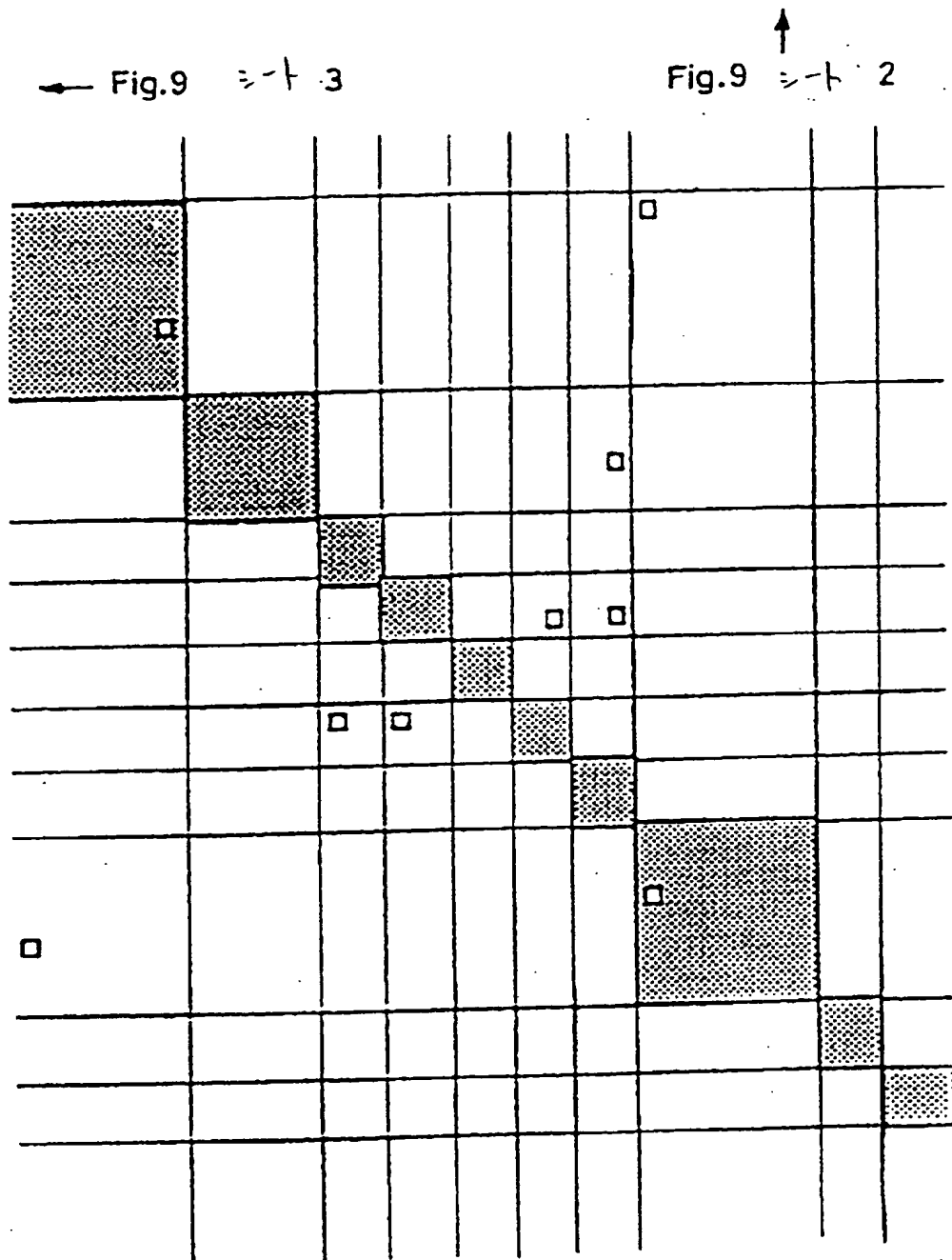


Fig. 9 シート 4

【図10】

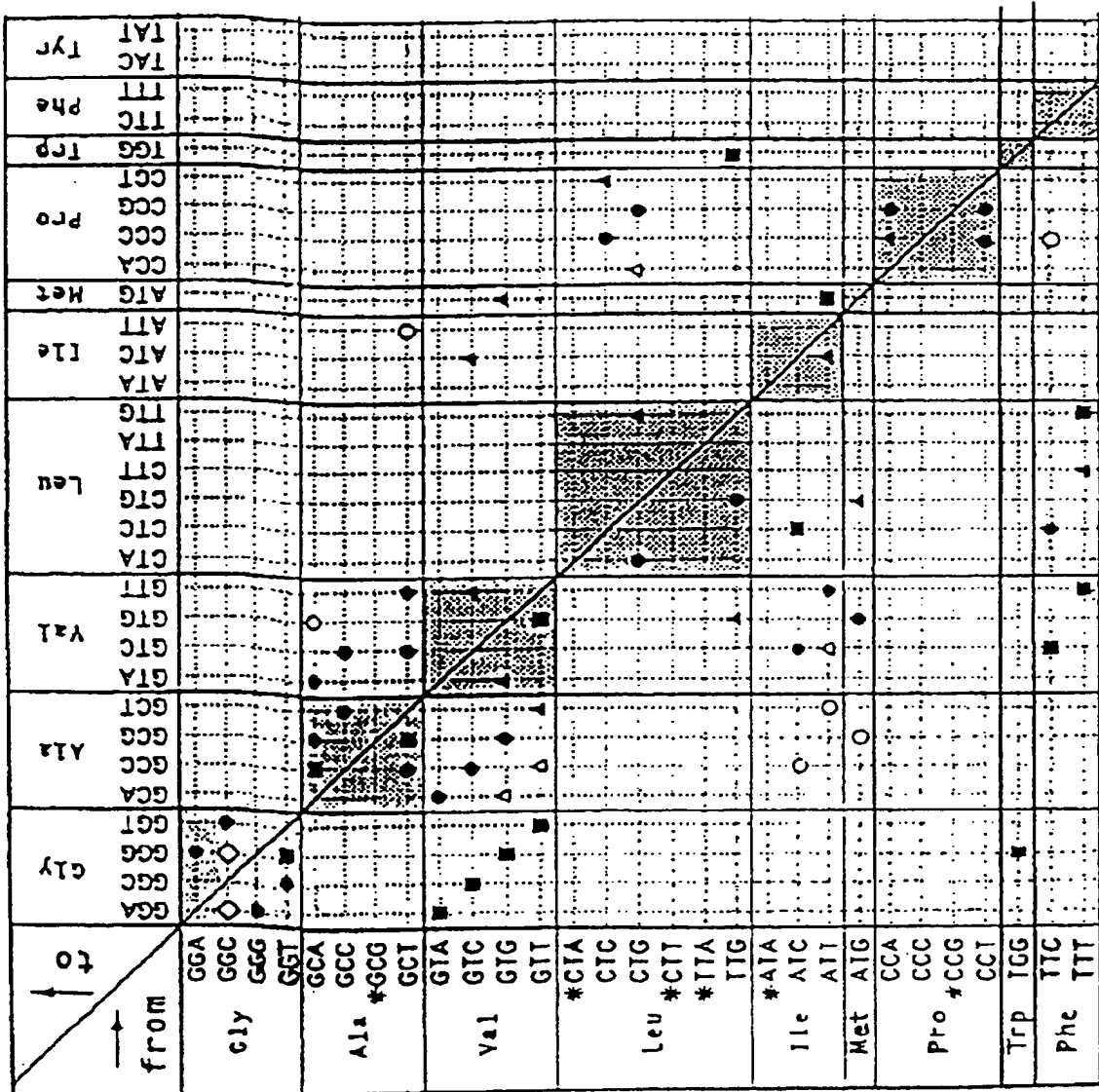


Fig. 10 2-1-2

Fig. 10 2-1-1

Fig 10 2-1-3

Fig. 10
-t 2

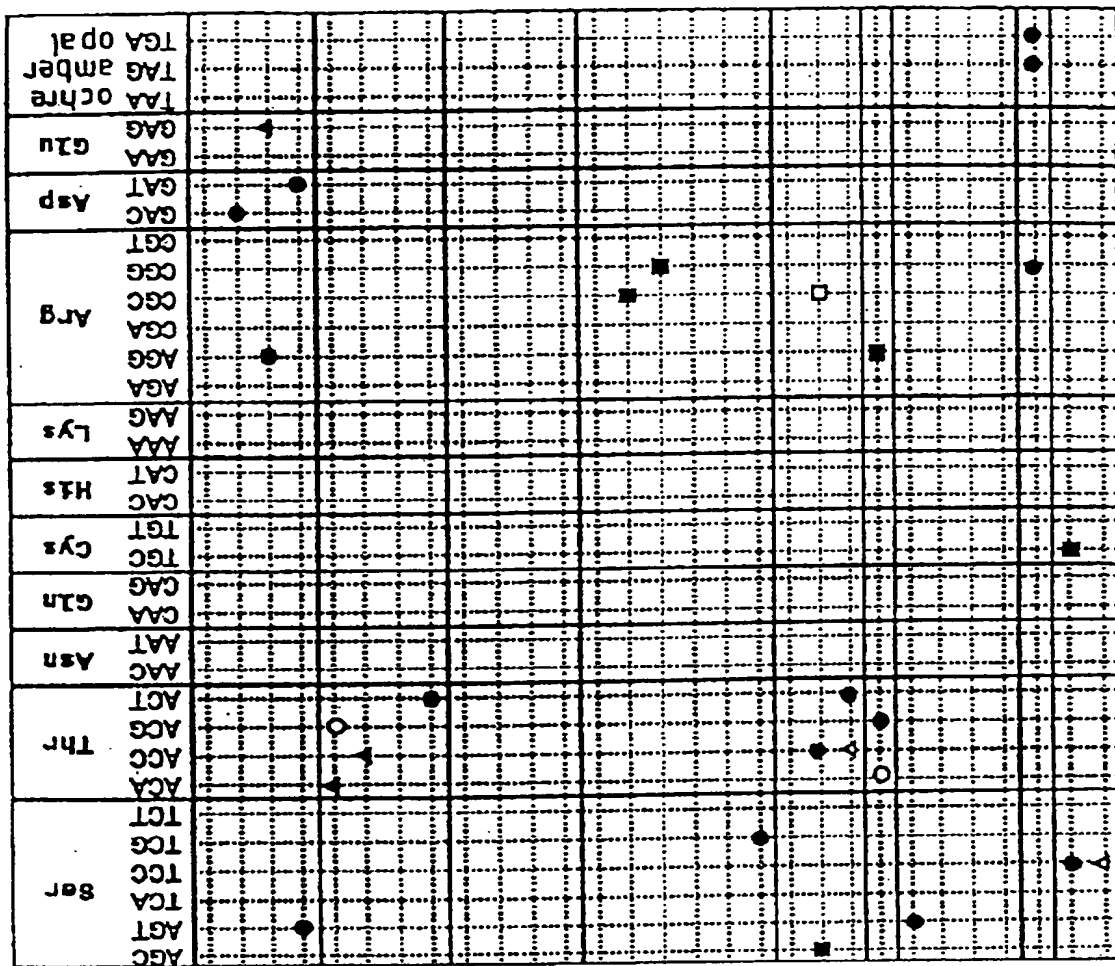


Fig. 10

Fig. 10
2-14

Fig. 10 →

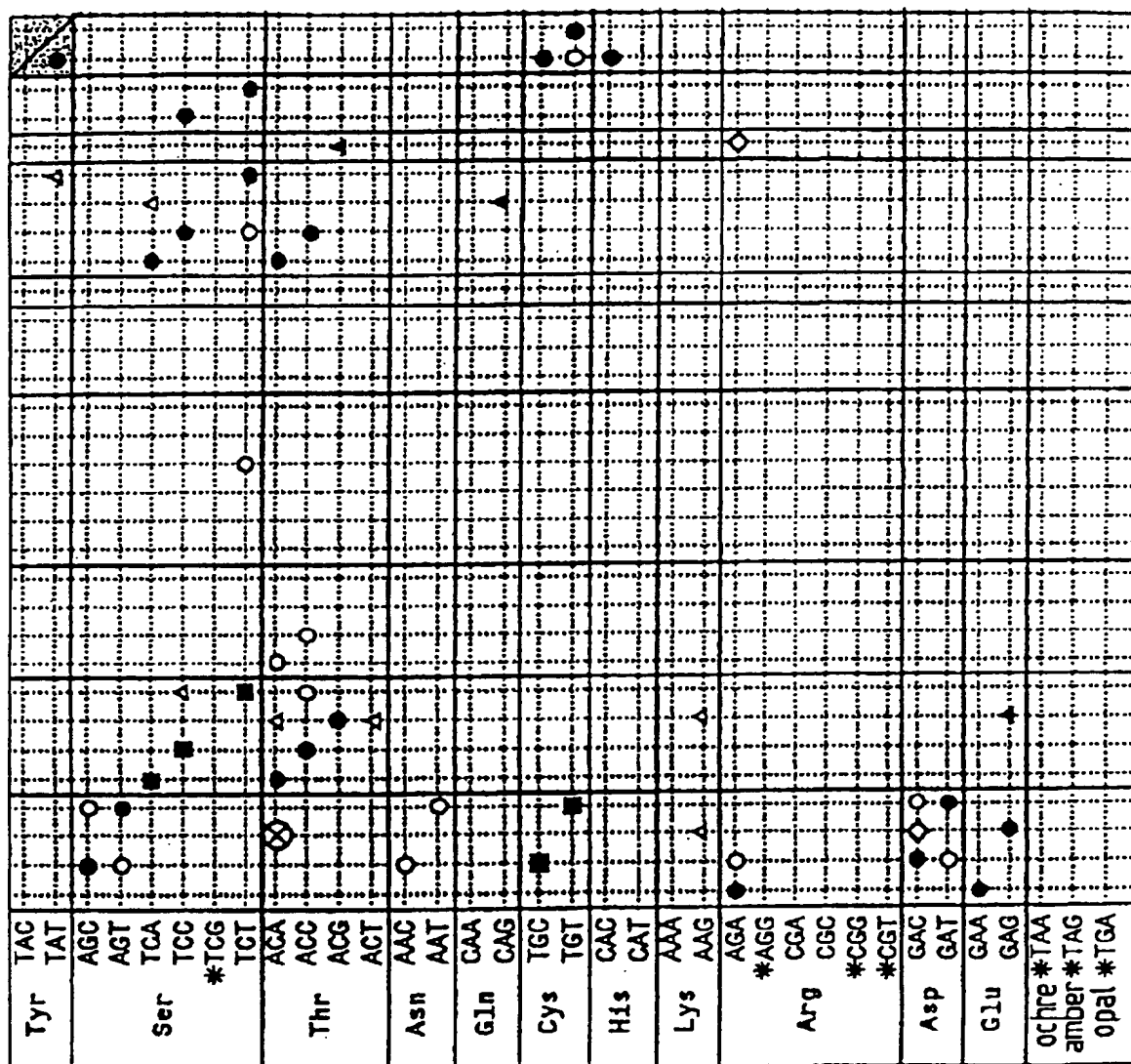
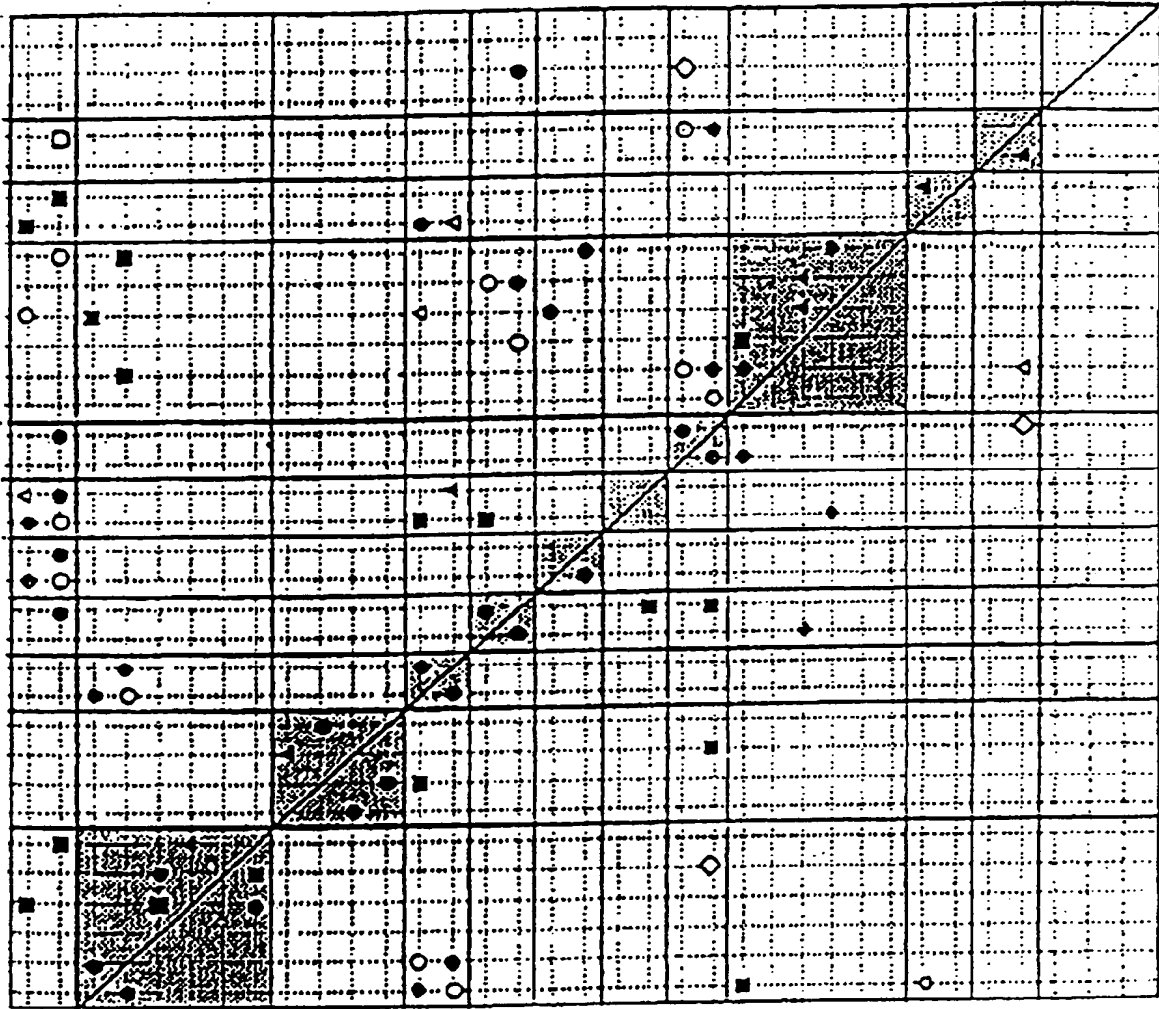


Fig. 10
2-11

Fig. 10 3

【図10】

Fig. 10
2Fig. 10
3Fig. 10
4

[11]

A	+10										+20											
	E	S	G	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F
22	GAG	TCT	GGA	GGA	GGA	TTG	ATC	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	GCC	TCT	GGG	TTC
P1.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P1.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P1.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P5.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P5.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P10.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P10.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P18.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P30.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P30.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P30.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P30.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig. 11A

[illegible]

Fig. 11A \rightarrow 2

[illegible]

Fig. 11A

[illegible]

Fig. 11A - 4

【図11】

B	+10										+20									
	E	S	G	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A		
22	GAG	TCT	GGA	GGA	GGC	TTG	ATC	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA		
G12.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G12.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G12.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G12.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G18.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G18.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G18.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G18.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.4	---	---	---	---	---	---	V	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.5	---	---	---	---	---	---	G	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
G30.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig 11B
シフト1

+83

R A E D T A V Y Y C A R
AGA GCT GAG GAC ACG GCC GTG TAT TAC TGT GCA AGA
-----C-----

-----C-----
-G-----
-----D-----C-----

-----C-----
-----C-----
-----G-----G-----G-----G-----
-----G-----
-----G-----
-----C-----

【図11】

Fig. 11B
シ-15

[図11]

C	+10										+20									
	E	S	G	G	L	I	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A		
22	GAG	TCT	GGA	GGA	GGC	TTG	ATC	CAG	CCT	GGG	GGG	TCC	CTG	AGA	CTC	TCC	TGT	GCA	CCC	
P+G8.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G8.3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G8.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G8.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G12.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G12.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.1	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.5	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.8	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P+G30.10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Fig.11C

[illegible]

Fig. 11C
-13

	+70	+80	+82	a	b	c	+83												
F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R
TTTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAC	AAT	TCC	AAG	AAC	ACG	CTG	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AGC	CTG	AGA
	T		K													S	G		
	-C	-	-	-A-	-	-	-	-	-	-	-	-G	-	-	-	-GT	G-	-	-
					H				D										
					C-				G-										
																	G		
																	G-		
	A			S				R	D				P						
	G-			AG-	-C			-G-	G-				-C-						-G-
		A							M										
	G-			G-					T-										
	S	A	P		G	S	P		G								G	P	G
	-C-	-	GC-	-C-	-G-	-G-	-C-	-	GG-	-A-							G-T	-CA	G-G
	P	A	A	P	G	G	S		G	M				A	GG				
	CC-	G-	GC-	-C-	-GT-	-GC-	-	GG-	-T-										-G-
				P		D			T		P			R		D		P	
				-C-	-	GC-	-	-	-C-	-	-C-		T-	GG	-	G-	-	-C-	
	L		T						D			C				S			
	-C-	-	-C-	-	-	-	-	-	G-			G-				G-			
			T	A	S	G		P	R	D					V	D			
	-	-	-C-	G-T	-C-	G-	-	-C-	G-	G-					G-	G-			-G-
	L		V	P		G		P	G	S	M	H	P			D			
	-	-	G-	-C-	-	-G-	-C-	GG-	G-	-T-	-	-C-	-C-	-G	-	G-	-T		-G-
	L		V			G	S	P		S		P			T	H			G
	-	-	G-	-	-G-	-GC	-	-	-G-	-	-	-C-	-	-	-C-	-			-G-
	P		V	P	G				D			C			-C-	G		R	G
	CC-	-	G-	-C-	-	-C-	-	-	G-	-	-A-	-G-	-	GG	G-	GG-	-	-G-	-G-

Fig. 11C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Patent Application No.
PL 1/GB 96/02333

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 19, 1 October 1991, LETCHWORTH GB, pages 1357-1359, XP002020578 A. R. HEDDERMAN ET AL: "Base Pairing of Cytosine Analogues with Adenine and Guanine in Oligonucleotide Duplexes: Evidence for Exchange between Watson-Crick and Wobble Base Pairs using 1H NMR Spectroscopy" see the whole document ---	1-18
Y	NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 14, no. 3-5, May 1995 - July 1995, pages 291-293, XP002020579 D. LOAKES ET AL: "The Synthesis of Bicyclic N4-Amino-2'-Deoxycytidine Derivatives" see the whole document ---	1-18
Y	NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 14, no. 3-5, May 1995 - July 1995, pages 1057-1059, XP002020580 L. VAN MEERVELT ET AL: "To Wobble or not to Wobble: Modified Bases Incorporated into DNA" see the whole document ---	1-18
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 119, no. 5, 2 August 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 43094, A. N. HEDDERMAN ET AL: "Molecular Basis for Methoxyamine-Initiated Mutagenesis: Proton Nuclear Magnetic Resonance Studies of Oligonucleotide Duplexes Containing Base-Modified Cytosine Residues" page 320; column 1; XP002020590 see abstract & JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 230, no. 3, 1993, pages 1068-1076, ---	1-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PLI/GB 96/02333

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 123, no. 17, 23 October 1995 Columbus, Ohio, US; abstract no. 221037. M. H. MOORE ET AL: "Direct Observation of Two Base Pairing Modes of a Cytosine-Thymine Analog with Guanine in a DNA Z-Form Duplex: Significance for Base Analog Mutagenesis" page 420; column 2; XP002020591 see abstract & JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 251, no. 5, 1995, pages 665-673, ---	1-18
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 19, 11 October 1992, OXFORD GB, pages 5149-5152, XP002020581 P. KONG THOO LIN ET AL: "Synthesis of Oligodeoxyribonucleotides Containing Degenerate Bases and their Use as Primers in the polymerase Chain Reaction" cited in the application see the whole document ---	1-18
X	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 261, no. 5, 15 February 1986, MD US, pages 2020-2026, XP002020582 M. THABIT ABDUL-MASIH ET AL: "Biochemical Studies on the Mutagen, 6-N-Hydroxylaminopurine" ---	19-24
Y	see the whole document, in particular page 2024, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1 and page 2025, figure 8 ---	19-24
X	M. ABDUL-MASIH: "Biochemical Studies on the Synthesis of 6-N-Hydroxylaminopurine Deoxynucleotide Triphosphate and its Incorporation into Deoxyribonucleic Acid, Dissertation Abstracts Int. B, 1986, 46(6), 1900" 1985, JOHN HOPKINS UNIVERSITY BALTIMORE, US, BALTIMORE, US XP002020589 ---	19-24
Y	see the whole document ---	19-24
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PL 1/GB 96/02333

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 390, no. 1, 1975, pages 1-13, XP002020583 E. I. BUDOVSKI ET AL: "Mechanism of the Mutagenic Action of Hydroxylamine. VIII. Functional Properties of the Modified Adenosine Residues"	19-24
Y	see the whole document ---	19-24
X	FEBS LETTERS, vol. 139, no. 1, 1982, AMSTERDAM NL, pages 69-71, XP002020584 B. SINGER ET AL: "Reaction of O-Methylhydroxylamine with Adenosine Shifts Tautomeric Equilibrium to Cause Transitions"	19-24
Y	see the whole document ---	19-24
X	JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 44, no. 1, 1969, pages 205-207, XP002020585 E. I. BUDOVSKI ET AL: "Mechanism of Mutagenic Action of Hydroxylamine. II Reaction of Hydroxylamine with the Adenosine Nucleus"	19-24
Y	see the whole document ---	19-24
X	ACTA BIOCHIMICA POLONICA, vol. 23, no. 1, 1976, pages 57-68, XP002020586 C. JANION ET AL: "The Synthesis and Properties of N6-Substituted 2-Aminopurine Derivatives"	19-24
Y	see the whole document ---	19-24
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 77, no. 5, 31 July 1972 Columbus, Ohio, US; abstract no. 32695, K. NAKAYAMA ET AL: "6-Hydroxylaminopurine Ribotides by Bacterial Fermentation" page 376; column 1; XP002020592 see abstract & JP 72 008 596 A (KYOWA FERMENTATION INDUSTRY CO., LTD.) 11 March 1972 ---	19
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

Pct/GB 96/02333

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 71, no. 19, 10 November 1969 Columbus, Ohio, US; abstract no. 89293, G. DONALDSON ET AL: "Synthesis and Regulatory Properties of an Adenosine 5'-Phosphate Analog, N6-Methoxyadenosine 5'-Phosphate" page 168; column 1; XP002020593</p>	19,20
Y	<p>see abstract & BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 184, no. 3, 1969, pages 655-657, ---</p>	21-24
Y	<p>BIOCHEMISTRY, vol. 27, no. 16, 9 August 1988, EASTON, PA US, pages 6008-6013, XP002020587 K. R. TINDALL ET AL: "Fidelity of Synthesis by the Thermus Aquaticus DNA Polymerase" see the whole document, in particular, page 6009, column 2 ---</p>	1-24
P,X	<p>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, vol. 255, no. 4, 1996, pages 589-603, XP002020588 M. ZACCOLO ET AL: "An Approach to Random Mutagenesis of DNA Using Mixtures of Triphosphate Derivatives of Nucleoside Analogues" see the whole document -----</p>	1-18

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 ブラウン, ダニエル
イギリス、シイ・ビー・1 4・ユー・イー
ケンブリッジ、ハーティントン・グループ、60

(72)発明者 ザッコロ, マニュエラ・カーラ
イギリス、シイ・ビー・2 2・エイチ・エス
ケンブリッジ、トランピントン、アルファ・テラス、33

(72)発明者 ゲラルディ, エルマンノ
イギリス、シイ・ビー・1 4・アール・エックス
ケンブリッジ、ロザリック・ウェイ、14

THIS PAGE BLANK (USPTO)